



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Зоран Недељко Ковачевић  
**ПОЛИМОРФИЗМИ ГЕНА ЗА ГАЛЕКТИН-3 КОД  
БОЛЕСНИКА У ТЕРМИНАЛНОЈ ФАЗИ РЕНАЛНЕ  
ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ**

докторска дисертација

Крагујевац, 2022



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Zoran Nedeljko Kovačević  
**POLIMORFIZMI GENA ZA GALEKTIN-3 KOD  
BOLESNIKA U TERMINALNOJ FAZI RENALNE  
INSUFICIJENCIJE**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2022



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
FACULTY OF MEDICAL SCIENCE

Zoran Nedeljko Kovacevic

**GALECTIN-3 GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS  
WITH END-STAGE RENAL FAILURE**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2022

<b>Аутор</b>
Име и презиме: Зоран Ковачевић
Датум и место рођења: 12.03.1974. године, Шабац, Република Србија
Садашње запослење: Клиника за нефрологију и дијализу, Универзитетски Клинички центар Крагујевац
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: Полиморфизми гена за галектин-3 код болесника у терминалној фази реналне инсуфицијенције
Број страница: 113
Број слика: 5 Број графика: 3 Број табела: 8
Број библиографских података: 465
Установа и место где је рад израђен: Клиника за нефрологију и урологију, Центар за хемодијализу, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу; Институт за хуману генетику Медицински факултет у Београду
Научна област (УДК): медицина
<b>Ментори:</b> Проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу; Проф. др Татјана Лазаревић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
<b>Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: 09.06.2021. године
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: бр. IV-03-564/11 од 14.07.2021. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Доц. др Марина Милетић Ковачевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник; 2. Проф. др Александар Ђукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка физиологија, члан; 3. Доц. др Ана Вујић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Педијатрија, члан; 4. Доц. др Маја Саздановић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан; 5. Проф. др Нела Максимовић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хумана генетика, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
Датум одбране дисертације:

<b>Autor</b>
Ime i prezime: Zoran Kovačević
Datum i mesto rođenja: 12.03.1974. godine, Šabac, Republika Srbija
Sadašnje zaposlenje: Klinika za nefrologiju i dijalizu, Univerzitetski Klinički centar Kragujevac
<b>Doktorska disertacija</b>
Naslov: Polimorfizmi gena za galektin-3 kod bolesnika u terminalnoj fazi renalne insuficijencije
Broj stranica: 113
Broj slika: 5 Broj grafika: 3 Broj tabela: 8
Broj bibliografskih podataka: 465
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Klinika za nefrologiju i urologiju, Centar za hemodijalizu, Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu; Institut za humanu genetiku Medicinski fakultet u Beogradu
Naučna oblast (UDK): medicina
<b>Mentori:</b> Prof. dr Biljana Ljujić, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu; Prof. dr Tatjana Lazarević, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
<b>Ocena i odbrana</b>
Datum prijave teme: 09.06.2021. godine
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: br. IV-03-564/11 od 14.07.2021. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
1. Doc. dr Marina Miletić Kovačević, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Histologija i Embriologija, predsednik; 2. Prof. dr Aleksandar Đukić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Patološka fiziologija, član; 3. Doc. dr Ana Vujić, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Pedijatrija, član; 4. Doc. dr Maja Sazdanović, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Histologija i Embriologija, član; 5. Prof. dr Nela Maksimović, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu obćast Humana genetika, član.
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije:
Datum odbrane disertacije:

<b>Author</b>
Name and surname: Zoran Kovacevic
Date and place of birth: 12.03.1974. Sabac, Republic of Serbia
Current employment: Clinic for Nephrology and Dialysis, University Clinical Center Kragujevac
<b>Doctoral Dissertation</b>
Title: Polymorphisms of the gene for galectin-3 in patients in the terminal phase of renal insufficiency
No. of pages: 113
No. of images: 5
No. of graphs: 3
No. of tables: 8
No. of bibliographic data: 465
Institution and place of work: Clinic for Nephrology and Urology, Center for Hemodialysis, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac; Institute for Human Genetics, Faculty of Medicine in Belgrade
Scientific area (UDK): medicine
<b>Mentors:</b> Assoc. prof. Biljana Ljubic, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac; Assoc. prof. Tatjana Lazarevic, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
<b>Grade and Dissertation Defense</b>
Topic Application Date: 09.06.2021.
Decision number and date of acceptance of the doctoral / artistic dissertation topic: no IV-03-564/11 from 14.07.2021.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Assis. prof. Marina Miletic Kovacevic, Assistant professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Histology and Embriology, president;</li> <li>2. Assoc. prof. Aleksandar Djukic, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Pathological physiology, member;</li> <li>3. Assis. prof. Ana Vujic, Assistant professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Pediatrics, member;</li> <li>4. Assis. prof. Maja Sazdanovic, Assistant professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Histology and Embriology, member;</li> <li>5. Assoc. prof. Nela Maksimović, Associate professor of Faculty of Medicine University of Belgrade for the narrow scientific field of Human genetics, member.</li> </ol>
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation:
Date of Dissertation Defense:

*Искрено и од срца се захваљујем својим менторима проф. др Биљани Љујић и проф. др Татјани Лазаревић на подршци, помоћи и разумевању.*

*Захваљујем се проф. др Нели Максимовић на несебичној помоћи у изради ове докторске дисертације, као и доц. др Марини Милетић Ковачевић.*

*Захваљујем мојој пријатељици и колегиници проф. др Маји Саздановић на помоћи приликом прикупљања података.*

*Захваљујем се породици.*

## САЖЕТАК

*Сврха истраживања* Галектин 3 (енгл. Galectin 3, Gal-3) игра значајну улогу у развоју хроничне реналне инсуфицијенције, посебно у терминалној фази реналне инсуфицијенције (TFRI). Циљ студије је био да се испита повезаност између Gal-3 и биохемијских параметара и примарне болести код пацијената са TFRI, истраживањем полиморфизама *LGALS3*rs4644, rs4652 и rs11125. У студију је укључено укупно 108 пацијената са TFRI-ом и 38 здравих контрола. Генотипизација гена Gal-3 који је кодиран геном *LGALS3* (енгл. *Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 3*), rs4644, rs4652 и rs11125 је извршена методом реакције ланчане полимеризације-рестриктоног фрагмента-полиморфизмом дужине (PCR-RFLP).

*Резултати* Мултиваријантном логистичком регресионом анализом, показано је да су генотипови *LGALS3* rs4644 CC и rs4652 AA значајно повезани са већим ризиком за снижене вредности хемоглобина, виши ниво паратироидног хормона (paratireoidni hormon, PTH) као и појаву дијабетес мелитуса и артеријске хипертензије. САА хаплотип је био значајно чешћи код пацијената са дијабетесом, ниским нивоом хемоглобина и нормалним нивоом PTH. Такође је примећено да је АСТ хаплотип био чешћи код пацијената са смањеном јачином гломерулске филтрације (JGF), ниским PTH и нормалним нивоом хемоглобина. Открили смо да полиморфизам гена *LGALS3*rs4644 и rs4652 може бити укључен у патогенезу и појаву компликација код пацијената са TFRI и стога се може сматрати новим генетским фактором ризика у овој популацији.

**Кључне речи:** галектин 3; полиморфизми; терминална фаза реналне инсуфицијенције; дијабетес мелитус; артеријска хипертензија



## **ABSTRACT**

Galectin 3 plays a significant role in the development of chronic renal failure, particularly end-stage renal disease (ESRD). The aim of our study was to investigate the association between Gal-3 and biochemical parameters and primary disease in ESRD patients, by exploring the polymorphisms LGALS3 rs4644, rs4652, and rs11125. A total of 108 ESRD patients and 38 healthy controls were enrolled in the study. Genotyping of LGALS3 gene rs4644, rs4652, and rs11125 polymorphisms was performed by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). By multivariate logistic regression analysis, we found that LGALS3 rs4644 CC and rs4652 AA genotypes were significantly associated with a higher risk for lower hemoglobin, higher level of parathyroid hormone, and also occurrence of diabetes mellitus and arterial hypertension. The CAA haplotype was significantly more common in patients with diabetes, low hemoglobin level, and normal PTH level. It has been observed as well that the ACT haplotype was more common in patients with low glomerular filtration, low PTH, and normal hemoglobin level. We found that the LGALS3 rs4644 and rs4652 gene polymorphism may be involved in the pathogenesis and appearance of complications in ESRD patients and thus could be considered a new genetic risk factor in this population.

**Keywords:** galectin 3; polymorphisms; end-stage renal disease; diabetes mellitus; arterial hypertension

## САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Уводни део.....	1
1.2. Хронична ренална инсуфицијенција.....	2
1.3. Патологија хроничне реналне инсуфицијенције.....	3
1.4. Епително- мезенхимална транзиција.....	4
1.5. HRI и кардиоваскуларне болести.....	5
1.6. Предложени механизми и веза HRI и кардиоваскуларних болести.....	6
1.7. Опште карактеристике узрока и последица TFRI.....	7
1.8. Патогенетски значај системске/локалне хронична инфламације ниског степена у настанку TFRI.....	10
1.9. Типични обрасци класичне инфламације код HRI и TFRI.....	12
1.10. Системски инфламаторни процеси у TFRI .....	13
1.11. Карактеристике развоја SIR-a у TFRI.....	14
1.12. Системски инфламаторни феномени специфични за TFRI.....	14
1.13. Породица лектина.....	17
1.14. Gal-3 .....	17
1.15. Експресија и улога Gal-3.....	19
1.16. Инхибитори Gal-3.....	19
1.17. Интеракције Gal-3 са ћелијама имунског система.....	19
1.18. Gal-3 и моницитно/макрофагна лоза.....	20
1.19. Gal-3 и неутрофили.....	21
1.20. Gal-3 и дендритске ћелије.....	21
1.21. Антимикробно дејство Gal-3.....	21
1.22. Gal-3 и инфламаторни имунски одговор.....	22
1.23. Деловање егзогеног Gal-3 .....	22
1.24. Gal-3 и имунски одговор in vivo.....	25
1.25. Gal-3 у кардиоваскуларним болестима.....	26
1.26. Gal-3 и малигна обољења.....	27
1.27. Gal-3 у болестима бубрега.....	28

1.28.	Gal-3 у бубрезима.....	28
1.29.	Gal-3 у претклиничким моделима болести бубрега.....	28
1.30.	Токсично оштећење.....	29
1.31.	Гломеруларно оштећење.....	29
1.32.	Gal-3 у имунски посредованим оштећењима бубрега.....	30
1.33.	Модел кардио-ренталног синдрома.....	32
1.34.	Gal-3 као биомаркер.....	33
1.35.	Перспектива и терапијски циљ Gal-3 .....	37
1.36.	Полиморфизми гена за Gal-3.....	38
2.	ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ .....	41
2.1.	ЦИЉ СТУДИЈЕ.....	41
2.2.	ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ.....	41
3.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	42
3.1.	Пацијенти.....	42
3.2.	Одређивање серумских концентрација биохемијских параметара .....	43
3.3.	Методe молекуларне генетике.....	43
3.4.	Статистичка анализа.....	47
4.	РЕЗУЛТАТИ.....	48
4.1.	Опште карактеристике испитиваних пацијената.....	48
4.2.	Студија генетске повезаности.....	49
4.3.	Полиморфизми Gal-3 гена повезани са клиничким/биохемијским параметрима.....	51
4.4.	Учесталост хаплотипова према клиничким и биохемијским параметрима пацијената са TFR1.....	52
4.5.	Поређење полиморфизама гена Gal-3 између пацијената са TFR1 са различитим врстама примарне болести.....	54
5.	ДИСКУСИЈА.....	58
6.	ЗАКЉУЧАК.....	64
7.	РЕФЕРЕНЦЕ.....	71

# 1. УВОД

## 1.1. Уводни део

Хронична ренална инсуфицијенција (HRI) је велики здравствени проблем широм света. Последња фаза HRI је терминална фаза реналне инсуфицијенције (TFRI). TFRI често је компликована анемијом, уремичком кардиомиопатијом и реналном остео дистрофијом, што може бити фатално (1). Стога је неопходно идентификовати факторе ризика који могу довести до TFRI или смрти. Поред добро дефинисаних раних маркера као што су дијабетес, хипертензија и гојазност, неопходно је идентификовати и друге маркере који би помогли у предвиђању болести. Показало се да генетски фактори такође утичу на функцију бубрега, патогенезу и прогресију болести, што потврђују и резултати студија повезаности на нивоу генома (енгл. *genome-wide association studies*, GWASs). Резултати GWASs показују да на JGF и функцију бубрега утиче неколико генских локуса (2).

Gal-3 је једини репрезентативни химерни тип из породице галектина, који формира пентамерну структуру на површини ћелије након везивања за гликопротеине или гликолипиде [3]. Резултати бројних студија су показали да Gal-3 игра значајну улогу у фибрози, запаљењу и пролиферацији (4, 5, 6). Повећани нивои Gal-3 у циркулацији су повезани са различитим болестима, укључујући рак, имунолошке поремећаје и кардиоваскуларне болести (KVB) (7). Два најчешћа локуса полиморфизма појединачног нуклеотида (енгл. *single nucleotide polymorphism*, SNP) лоцирана су на хромозому 14 у егзону *LGALS3*, а то су варијанте rs4644 и rs4652. Варијанта rs4644 +191 C>A замењује хистидин пролином на остатку 64, док варијанта rs4652 +292 A>C мења треонин на остатку 98 у пролин (8).

Резултати студије су показали билатералну улогу различитих варијанти Gal-3 у различитим врстама малигнитета. Претходне студије су показале да генетске варијанте на два места SNP гена Gal-3 могу да промене нивое протеина Gal-3 (7). Код пацијената са акутном срчаном инсуфицијенцијом показано је да су мерење плазматске концентрације Gal-3 у једној временској тачки и тежина фиброзе миокарда, оба предиктори за композитни исход морталитета свих узрока и поновне хоспитализације након 1 године праћења. Међутим, није пронађена повезаност између полиморфизама гена који кодира Gal-3 (rs4644 и rs4652), концентрације Gal-3 у плазми и степена фиброзе миокарда [9]. Супротно томе, генотип rs4644 може бити повезан са нижом вентрикуларном ејекционом фракцијом код пацијената са дилатативном кардиомиопатијом (10).

Gal-3 игра значајну улогу у акутној реналној инсуфицијенцији (АРИ) као и у развоју ХРИ. Студије на животињским моделима сугеришу да су експресије Gal-3 значајно повећане и код исхемијских и код токсичних типова акутне реналне инсуфицијенције, и да играју важну улогу у акутном тубуларном оштећењу и следећој фази регенерације (11). Резултати мета-анализе сугеришу да високи нивои Gal-3 могу повећати ризик од морталитета свих узрока и кардиоваскуларних догађаја код пацијената са ХРИ, међутим, то вероватно није сензитиван биомаркер за исходе код пацијената на хемодијализи (12). Такође, резултати клиничке студије су показали да су нивои Gal-3 у плазми били повезани са реналном инсуфицијенцијом и лошијим преживљавањем код пацијената са хроничном систолном срчаном инсуфицијенцијом, али нису забележили везу између Gal-3 и ехокардиографских или хемодинамских индекса (13).

Такође, виши нивои Gal-3 корелирају са повећаним ризиком од инцидената HRI у општој популацији и значајно су повезани са брзим губитком бубрежне функције током 10 година праћења. Није примећена повезаност између нивоа албуминурије и нивоа Gal-3 у серуму (14). Ови подаци сугеришу да Gal-3 може да укаже на појединце са ризиком од развоја HRI много година пре клиничке манифестације болести. Такође постоји неколико малих студија које су испитивале улогу Gal-3 код пацијената у завршном стадијуму бубрежне болести. Студија коју су спровели *Mejires* и сарадници (15) су показала је да нивои Gal-3 у урину нису повећани код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, упркос значајно повећаним нивоима Gal-3 у плазми. У мултиваријабилном Cox пропорционалном моделу опасности, нивои Gal-3 изнад граничне вредности су остали независни предиктор свих узрока морталитета, што сугерише да је Gal-3 независни предиктор морталитета код пацијената на хемодијализи (16).

Ниво Gal-3 се сматра релевантним за различите третмане болести у неким студијама јер игра важну улогу у процесу инфламације и фиброзе. Али, однос између SNPs-а у Gal-3 гену и фенотипских варијација у HRI није процењен. Међутим, тренутно не постоји студија која посебно испитује корелацију полиморфизама Gal-3 гена са ризиком и прогнозом TFRI. Стога, ова студија намерава да истражи везу између Gal-3 и биохемијских параметара и примарне болести код пацијената са TFRI-ом истражујући полиморфизме *LGALS3*rs4644, rs4652, и rs11125. Ово може открити нови аспект прогнозе и лечења у будућности.

## 1.2. Хронична ренална инсуфицијенција

HRI је прогресивно стање које се одликује структурним и функционалним променама бубрега услед дејства бројних фактора. HRI се обично дефинише као смањење бубрежне функције, са процењеном JGF мањом од 60 mL/min на 1.73 m<sup>2</sup>, или маркерима оштећења бубрега, као што су албуминурија, хематурија, или абнормалностима детектованим лабораторијским испитивањем или *imaging* методама које су присутне најмање 3 месеца (17). Глобално оптерећење HRI је значајно и у порасту: приближно 10% одраслих широм света су погођени неким обликом HRI, што доводи до 1,2 милиона смртних случајева (18,19). Процењује се да ће до 2040.год. HRI постати пети водећи узрок смрти у свету (20). Постоје многи узроци HRI, као што су дијабетес, гломерулонефритис, цистичне болести бубрега, загађење ваздуха, иако тачан узрок HRI још увек није у потпуности познат (21, 22). Тежина HRI такође варира од оштећења бубрега са нормалном функцијом до отказивања бубрега и TFRI, што се обично дешава када се JGF смањи на мање од 15 mL/min на 1.73 m<sup>2</sup>. Генерално, преваленција HRI се повећава са годинама и у развијеним земљама, чешћа је код гојазних, дијабетичара и хипертоничара (23, 24). HRI је обично подмукла, а већина оболелих особа нема симптоме све док болест не узнапредује (тј. док се JGF не смањи на мање од 30mL/min per 1.73 m<sup>2</sup>). Стопа губитка бубрежне функције варира у зависности од етиологије, изложености и интервенција, али, у већини случајева, да би се болест развила до реналне инсуфицијенције обично је неопходно неколико месеци до неколико деценија. Знаци и симптоми реналне инсуфицијенције су резултат прогресивне уремије, анемије, хиперволемије, абнормалности електролита, поремећаја минерализације и костију, ацидемије, и неминовно доводе до смрти уколико се не лече (25). Терапија замене бубрега, било у облику хроничне дијализе или трансплантације

бубрега, је лечење које се заснива на принципу животног одржавање људи са реналном инсуфицијенцијом. Недостатак донора бубрега и коморбидитети који се развијају са годинама, често онемогућавају трансплантацију бубрега, (26, 27) тако да дијализа остаје преовлађујућа опција лечења за већину људи са реналном инсуфицијенцијом (28). Отказивање бубрега које захтева дијализу је често повезано са значајно смањеним квалитетом живота и високом стопом морталитета посебно у првој години након преласка на дијализу (29, 30).

### 1.3. Патофизиологија хроничне реналне инсуфицијенција

Смртност од HRI широм света брзо расте, што указује на недостатке тренутних терапијских приступа у лечењу ове болести (31). Инциденција HRI и њен апсолутни допринос KVB и морталитету расте са годинама; преко 60% људи старости  $\geq 80$  година има HRI(32). Пацијенти са HRI имају повећан ризик од акутног оштећења бубрега (енгл. *Acute kidney injury*, AKI) и поновљене епизоде AKI доприносе прогресији HRI (познато као AKI-у-HRI прелаз). Слично, AKI може довести до развоја HRI (33). Независно од узрока, HRI се карактерише прогресивним и иреверзибилним губитком нефрона, смањеним регенеративним капацитетом бубрега, микроваскуларним оштећењем, метаболичким променама, оксидативним стресом и запаљењем, што на крају доводи до фиброзе (34–40). Фиброза је део нормалног процеса репарације који се покреће као одговор на повреду и чува архитектуру и функционални интегритет ткива. Међутим, поремећај регулације овог процеса резултује патолошком акумулацијом протеина екстрацелуларног матрикса (енгл. *Extracellular matrix*, ECM), углавном колагена (35). У HRI, губитак подоцита и њихова замена ECM-ом (који се назива гломерулосклероза), повреда тубуларних ћелија и накнадна тубулоинтерстицијска фиброза доприносе губитку нефрона (37,39). Ови процеси резултирају заменом паренхимског ткива ECM-ом и пратећим неповратним оштећењем. Дакле, без обзира на етиологију, HRI напредује до тубулоинтерстицијалне фиброзе, која јаче корелира са протеинуријом и тежином болести него хистолошка повреда гломерула (41). Тубулоинтерстицијалне болести такође доводе до гломерулосклерозе. Током протеклих 10 година, истраживање усмерено на идентификацију нових терапијских циљева HRI фокусирао се на молекуларне и ћелијске путеве који покрећу акумулацију ECM-а, процес познат као фиброгенеза. Подаци из претклиничких студија које су тестирале антифибротичне лекове на вишеструким моделима фиброзе органа и резултати клиничких испитивања пружили су информације о сигналним путевима који су кључни за фиброгенезу и истакли потребу за применом нових терапијских стратегија. Ове стратегије укључују модулацију запаљења, инхибицију профибротичких фактора раста и фокус на епигенетичке промене (42). Нефропротективни ефекат специфичне терапије за фиброзу је нејасан због недостатка клиничких података, упркос обећавајућим налазима у претклиничким моделима. Штавише, утврђено је да неки терапијски приступи за које се у почетку сматрало да првенствено модулирају молекуларне путеве који су директно укључени у фиброгенезу, такође модулирају додатне процесе, као што је запаљење, што отежава дефинисање заштитног пута који преовлађује *in vivo* (43). Један од значајних патофизиолошких механизма HRI је оксидациони стрес. Наиме, повећано стварање и/или смањено елиминисање слободних радикала стимулише инфламаторне процесе који индукују ендотелну дисфункцију и атеросклерозу, а тиме и

кардиоваскуларне болести (44). У инфламаторном процесу накупљају се полиморфонуклеари и моноцити који луче проинфламацијске цитокине и молекуле (интерлеукин 1 бета (енгл. *Interleukin 1 beta*, IL-1 $\beta$ ), IL-1, IL-6, фактор некрозе тумора алфа (енгл. *tumor necrosis factor  $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), Ц реактивни протеин (енгл. *C reactive protein*, CRP). Ствара се никотинамид аденин динуклетид фосфат (енгл. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) оксидаза која од молекуларног кисеоника одузима електрон и ствара супероксидни ањон који се ослобађа у ЕСМ или у фагоците и на тај начин разара ткиво. Заправо, што је нижа гломерулска филтрација, то су виши IL-1 $\beta$ , антагониста IL-1 рецептора, IL-6, TNF- $\alpha$ , CRP, фибриноген и албуминурија. Наиме, више вредности CRP-а и IL-6 корелирају са вишим морталитетом код болесника са НРИ и срчаним проблемима (44). Хемодијализа може да изазове оксидативни стрес (када се губе липофилни и хидрофилни антиоксиданти, спречава стварање антиоксиданских коензима и мења структура липида), као и стварање проинфламацијских цитокина. Маркери оксидативног оштећења бубрега су: 3-нитротирозин, F2-изопростан, оксихолестерол, оксигенисани LDL, липидна пероксидаза, малон диалдехид, 4-хидроксиноненал, оксидација дезоксирибонуклеинске (енгл. *Deoxyribonucleic acid*, DNA) и рибонуклеинске (енгл. *ribonucleic acid*, RNA) киселине и карбоксиметилизин (44). Након оштећења ткива, долази до миграције фибробласта и макрофага, који стварају непродуктивно везивно ткиво (45).

#### 1.4. Епително- мезенхимална транзиција

Бубрежна фиброза, укључујући нефросклерозу и тубулоинтерстицијску фиброзу, представља последњи уобичајени механизам бубрежних оштећења, независно од етиологије. Епително-мезенхимална транзиција (ЕМТ) је главни механизам који промовише реналну фиброзу, а миофибробласти су главни тип ћелија које производи ЕСМ (46). Порекло миофибробласта у бубрезима остаје неизвесно, мада се претпоставља да су то резидентни фибробласти, фибробласти изоловани из коштане сржи или да воде порекло из перицита или ендотелних ћелија (47). Недавна истраживања су открила да је ЕМТ прилично неуобичајена, јер се фибробласти изведени из ЕМТ-а ретко налазе у бубрежном интерстицијуму. Нови концепт парцијалне ЕМТ указује да тубуларне епителне ћелије добијају мезенхималне карактеристике, али остају везане за базалну мембрану, што може објаснити патогену улогу бубрежног тубуларног епитела у бубрежној фибрози (48). Након АКІ, у тубуларним епителним ћелијама се активира сигнал c-Jun NH<sub>2</sub>-терминална киназа (енгл. *c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase*, JNK) како би се побољшала експресија типичних мезенхимских маркера (нпр. е-кадхерин,  $\alpha$ -актин глатких мишића) и профиброгених фактора (трансформишући фактор раста  $\beta$  (енгл. *Transforming growth factor beta*, TGF- $\beta$ ) и фактор раста везивног ткива (енгл. *connective tissue growth factor*, CTGF) (49). Упорна активација TGF- $\beta$  резултира повећаном експресијом SNAI1 и TVIST1 и даље промовише заустављање ћелијског циклуса у G2/M фази. Све ово појачава профиброгене факторе, као што су TGF- $\beta$  и CTGF, и тако се ствара зачарани круг који кулминира прогресијом фиброзе (50). Оксидација масних киселина (енгл. *Fatty acid oxidation*, FAO) је главни извор енергије проксималног тубула (енгл. *Proximal tubule*, PCT). SMAD3 активиран посредством TGF- $\beta$  ће потиснути експресију PPARGC1 $\alpha$  и изазвати нерегулисану FAO са акумулацијом липида у PCT, што је једна од

карактеристика EMT-а (51). Ћелије PCT са акумулацијом липида ће стимулисати инфламацију, урођени имунски одговор и апоптозу што ће индуковати погоршање реналне фиброзе. Тубуларне ћелије са делимичним EMT такође могу да активирају фибробласте и регрутују инфламаторне ћелије преко секретума који се састоје од фактора раста, хемокина и цитокина, што додатно погоршава фиброзу (52). Утврђено је да се инхибицијом ћелијског циклуса или инхибицијом експресије SNAI1 или TVIST1 EMT-а супримира инфламација и фиброза, указујући на чињеницу да EMT може бити добар циљни механизам за третман реналне фиброзе (47,50). Коштани морфогенетски протеин-7 (BMP-7) може да преокрене EMT блокирајући TGF- $\beta$ /SMAD2/3 сигнални пут и да тако послужи као још један потенцијални терапеутски циљ за побољшање бубрежног оштећења (53). Међутим, резултати клиничких студија аналога BMP-7 који су укључивали пацијенте са HRI су хетерогени, што указује на сложену интеракцију између BMP-7 и других сигналних путева повезаних са EMT-ом (54). Епигенетске модификације, укључујући метилацију DNA и модификацију хистона, такође у великој мери учествују у регулацији делимичног EMT. Пријављено је да инхибиција метилације DNA ублажава фиброзу бубрега. На пример, ниске дозе хидралазина изазивају деметилацију NASAL1 промотора и 50-азациитидина, што доводи до инхибиције DNA метилтрансферазе 1 (енгл. *DNA methyltransferase*, 1 DNMT1) (55–57). Штавише, агенси усмерени на модификацију хистона такође доприносе побољшању реналне функције инхибицијом хистон метилтрансферазе или инхибицијом хистон деацетилазе (58–60). Епигенетика може бити нова терапијска мета у лечењу бубрежне болести.

### 1.5. HRI и кардиоваскуларне болести

HRI је често повезана са KVB (61, 62). Према извештају америчког бубрежног система података објављеном 2013. године, код 43% пацијената са HRI и KVB имало је затајење срца (енгл. *Heart failure*, HF), а 15% је имало историју акутног инфаркта миокарда (енгл. *Acute miocardial infarction*, AMI); Еквивалентне пропорције код пацијената са KVB без HRI су 18,5% и 6,4%, респективно (63). Показано је да пацијенти са узнапредовалом болешћу бубрега, (стадијум 4 или 5), имају висок ризик оболевања и морталитета од KVB (64). Код пацијената којима је потребна дијализа, KVB се препознају као водећи узрок смрти. Без обзира на то, данас се заговара да пацијенти са ранијим стадијумима HRI такође пате од високе стопе фаталних и нефаталних кардиоваскуларних догађаја (65). Недавна, проспективна кохортна студија закључила је да пацијенти у раним стадијумима HRI, чак и без манифестација васкуларне болести, имају повећан ризик од накнадне коронарне болести (61). Из тог разлога, сама HRI се сада посматра као независни фактор ризика за KVB и коронарну артеријску болест (енгл. *coronary artery disease*, CAD) -еквивалент смртности свих узрока (61). Битно је напоменути да је већа вероватноћа да ће пацијенти са HRI умирати од кардиоваскуларних догађаја уместо да развију реналну инсуфицијенцију и да заврше на терапији замене бубрега (66). Потенцијална објашњења коегзистенције ова два ентитета могу се објаснити следећим: 1. HRI је повезана са повећаном преваленцом традиционалних и нетрадиционалних фактора ризика за KVB, 2. HRI је независни фактор ризика за KVB, 3. многи фактори ризика за KVB погоршавају прогресију ХРИ, 4. KVB саме по себи може бити фактор ризика за HRI (67, 68). Посебно, пацијенти са HRI имају већу инциденцу повећаног кардиоваскуларног морбидитета и морталитета, што се може приписати не само традиционалним факторима кардиоваскуларног ризика,



већ и присуству широког спектра нетрадиционалних фактора ризика који су јединствени за пацијенте са HRI (67, 68). Ипак, Национална бубрежна фондација наглашава важност ране идентификације и лечења HRI и повезаних коморбидитета, укључујући KVB (69). Велика опсервациона студија пацијената са раном HRI која је праћена током 5,5 година је закључила да је 24,9% пацијената умрло пре него што су стигли на дијализу, док је 3,1% напредовало до потребе за терапијом замене бубрега, при чему је већина смртних случајева приписана кардиоваскуларним догађајима (70). Традиционални и међусобни фактори ризика између KVB и HRI су старост, хипертензија, дијабетес мелитус, дислипидемија, пушење, породична историја и мушки пол. Висок крвни притисак, ниво глукозе и липида, као и пушење могу се драстично модификовати. Међутим, токсични метаболити произведени уремијом код HRI као што су калцијум и фосфор, као и стања која мењају метаболизам хемијских елемената, одговорни су велики број кардиоваскуларних догађаја код пацијената са HRI, и познати су као нетрадиционални фактори ризика (71, 72).

### **1.6. Предложени механизми и веза HRI и кардиоваскуларних болести**

Срце и бубрези реагују на двосмерно сложен начин, тако да абнормалности у једном органу често најављују абнормалности у другом. Иако оба система органа деле заједничке факторе ризика ови традиционални фактори ризика сами по себи не објашњавају високу стопу KVB болести међу особама са HRI (73,74). Већина облика KVB је чешћа међу особама са HRI укључујући високу инциденцу атеросклеротичне кардиоваскуларне болести (AS KVB), HF, валвуларну болест срца и изненадну срчану смрт (75). Вишеструке студије у различитим популацијама пацијената показују да су, независно, смањена JGF и повећана албуминурија чак и у опсегу микроалбуминурије повезани са повећаним ризиком од кардиоваскуларног морталитета (76). Канадски подаци показују да се удео смртних случајева од KVB болести постепено повећава са 27,5% код пацијената у 1. и 2. стадијуму HRI на основу JGF до 58,0% међу пацијентима у 5. стадијуму HRI (77, 78). У Сједињеним Америчким државама (SAD), HRI је независни фактор ризика за CAD (65,79). Ранији подаци сугеришу да је HRI еквивалент ризика за CAD; међутим, таква парадигма није присутна у актуелним смерницама (61,80). Међу пацијентима са HF примљеним због акутне декомпензоване срчане инсуфицијенције, већина је имала значајан степен оштећења бубрега. Чак и незнатна смањења JGF имају значајан утицај на морталитет од свих узрока код пацијената са HF (81). Добро је утврђена веза између дислипидемије, инфламације и атеросклеротске KVB (82, 83). Ови фактори долазе у још већи фокус уколико је присутна значајна албуминурија и HRI, где њихово комбиновано присуство доводи до знатно израженијег атерогеног липидног профила. Ово је вероватно делимично због вишка оксидације холестерола липопротеина ниске густине (енгл. *low-density lipoprotein*, LDL-C) и неадекватне функције холестерола липопротеина високе густине (енгл. *high-density lipoprotein* HDL-C) (84). Типичан липидни профил код погоршања HRI и албуминурије показује повећање серумског нивоа триглицерида са високим VLDL и apoB, снижене нивое HDL-а и смањену синтезу apoA (85). Дислипидемија присутна у HRI може допринети инфламаторној каскади у реналној инсуфицијенцији. Повећање циркулишућих инфламаторних биомаркера код особа са HRI делимично се приписује оксидативном стресу, који се види код дислипидемије и уремије (86). Уремија такође

повећава периферно ослобађање инфламаторних цитокина, а ослабљена JGF смањује њихов клиренс. Хронична инфламација код HRI такође може бити посредована неухрањеношћу и хипоалбуминемијом. Инфламација услед малнутриције код HRI је суштински фактор који утиче на морталитет (87, 88). Хипертензија има двосмерни однос са HRI, у томе што може бити узрок или последица HRI. Међу пацијентима са HRI, повишење крвног притиска је често изазвано ретенцијом натријума, активацијом ренин ангиотензин-алдостеронског система (RAAS), прекомерном активношћу симпатичког нервног система и повећаном васкуларном ригидношћу. Ендотелна дисфункција се примећује код хипертензије и HRI. Постоји корелација између албуминурије и ендотелне дисфункције. Сматра се да ендотелна дисфункција доприноси кардиоваскуларном морталитету чак и код благе реналне инсуфицијенције, можда због смањене биорасположивости азот-оксида (енгл. *Nitric Oxide*, NO) (89–91, 93). Смањена биорасположивост NO утиче на контракцију глатких мишића крвних судова, агрегацију тромбоцита и адхезију леукоцита за ендотел. Смањена активност реналазе, чија је функција метаболизам катехоламина, примећује се код болести бубрега и вероватно доприноси ендотелној дисфункцији (92, 94). Поред тога, асиметрични диметиларгинин ( ) је умешан у ендотелну дисфункцију пацијената са HRI. ADMA компетитивно инхибира стварање NO, смањује минутни волумен срца и повећава системску васкуларну резистенцију. Његове концентрације у плазми су повећане код реналне инсуфицијенције и повезане су са хипертрофијом леве коморе (95–97). Калцифична атеросклероза и валвуларна болест срца су честе код HRI (98). Чак и у раној фази HRI поремећени су нормални регулаторни процеси фосфата и калцијума преко ендокриних хормона и интеракција дигестивног тракта, костију и бубрега. Резултат свега тога је активна калцификација – стимулисана повећањем калцијума и фосфата, запаљењем, повећаном апоптозом и исцрпљивањем инхибитора калцијума (99, 100). Појединци са HRI имају тенденцију да испоље један од два типа васкуларне калцификације, медијалне калцификације или калцификације интимае, а клиничке последице могу бити различите. Калцификација интимае се јавља у условима атеросклерозе и слична је код пацијената са и без HRI. Руптура атеросклеротског плака и каскада која следи резултати су болести интимае. Медијална калцификација доводи до повећане крутости артерија (101). Оба су повезана са лошијим кардиоваскуларним исходима. Коначно, постоји огроман број предложених механизма услед којих се код пацијената са HRI јављају високе стопе KVB.

### 1.7. Опште карактеристике узрока и последица TFRI

Прогресивни ток HRI је повезан са сталним смањењем JGF. Пети стадијум HRI, TFRI, захтева терапију замене бубрега, као што је перитонеална или програмирана хемодијализа (енгл. *programmed hemodialysis*, PH; „вештачки бубрег“), или трансплантација бубрега. Међутим, трансплантација алографта доступна је само за 10% пацијената којима су потребни нови органи (102). Преваленција TFRI је озбиљан друштвени проблем у многим земљама широм света. Тренутно, око три милиона пацијената са TFRI широм света стално зависи од PH, који само делимично замењује функцију бубрега. Број особа са TFRI-је само у SAD је премашио 785.000 до краја 2018. године (103), а постоји стални тренд раста у откривању ове болести (104). То је зато што се током хемодијализе углавном мале растворене супстанце уклањају из крвотока, док већи уремични токсини везани за протеине остају у крви (105). Сложено деловање

патогених фактора повезаних са TFR1 изазива склерозу артерија и калцификације, као и друге промене у кардиоваскуларном систему (106). Код TFR1, поремећаји у кардиоваскуларном систему могу бити изазвани нефротоксинима који изазивају директну повреду срца и крвних судова, као и секундарне метаболичке поремећаје и неуроендокрину дисфункцију (107). Дијагноза HRI се поставља када су структура и функција бубрега оштећени дуже од 3 месеца. Степен протеинурије и JGF су два најважнија индикатора стадијума HRI. Пети, терминални, стадијум HRI дефинисан је JGF мањом од 15 mL/min (104, 108). Међутим, клинички знаци нефротског синдрома, који потенцијално могу да погоршају прогресију реналне инсуфицијенције (едем, протеинурија >3,5 g/дан, хипоалбуминемија и хиперхолестеролемија), могу се појавити у раним стадијумима HRI (104, 109). Уремичка токсичност је индикација за започињање терапије замене бубрега и може се манифестовати у виду анорексије, мучнине, повраћања, крвареће дијатезе, перикардитиса, уремичке неуропатије или енцефалопатије, напада, коме и смрти (110,111). Одмакла старост, пушење, гојазност и други фактори нездравог начина живота (104,112–114), заједно са генетском пресиспозицијом (115,116), представљају факторе ризика за развој HRI која претходи TFR1.

Дијабетес мелитус, хипертензија, примарна и секундарна (узрокована системским еритематозним лупусом, системским васкулитисом, мијело- и лимфопролиферативним и другим болестима) гломерулонефритис, полицистична болест бубрега, опструктивна уропатија, везикоуретерални рефлукс, бубрежна амилоидна нефроза су најчешћи узроци TFR1 у развијеним земљама (104,111,112,117). Хронични пијелонефритис је инфламаторна болест пијелокалицеалног система која укључује тубулоинтерстицијално ткиво, што доводи до тубулоинтерстицијалне фиброзе и, на крају, потпуне нефросклерозе ако се не лечи. Хронични пијелонефритис, заједно са другим инфекцијама које изазивају развој различитих гломеруларних и тубулоинтерстицијских бубрежних болести, даје релативно значајнији специфични допринос развоју TFR1 код пацијената из земаља у развоју (118). Аутозомно доминантна тубулоинтерстицијална болест бубрега укључује ретке болести бубрега које карактерише оштећење тубула и интерстицијална фиброза у одсуству гломеруларних лезија, са неизбежном прогресијом до TFR1 (119).

Развој HRI и његово напредовање у TFR1 остају значајни фактори смањења квалитета живота и преране смрти. Морталитет код пацијената са TFR1 је значајно већи него код пацијената са HRI који немају TFR1, а чак и уз савремене технике хемодијализе, стопе смртности варирају од 20% до 50% током 24 месеца (104). Према резултатима аутопсије, главни узроци смрти пацијената са TFR1 су патологија кардиоваскуларног система, затим инфекције, као и цереброваскуларни, метаболички и други узроци (112,120). Штавише, почетни (претрауматски) TFR1 је независан фактор морталитета у критичним случајевима различите генезе (на пример, код акутне трауме) (121). Сечена (секундарна) цистична болест је често повезана са TFR1 и фактор је ризика за карциномом бубрежних ћелија (122). Најчешћи морфолошки облици гломерулонефритиса који доводе до TFR1, као и гломерулонефритис који доводи до смрти у TFR1, обично су повезани са фокалном сегментном гломерулосклерозом, мембранозним гломерулонефритисом, мезангијалним пролиферативним гломерулонефритисом, имунонефритисом, (IgA) нефропатијом (мезангијална и ендокапиларна хиперцелуларност >50% гломерула, гломерулосклероза, тубуларна

атрофија и интерстицијална фиброза), лупус нефритисом и оштећењем бубрега код *Shenlein–Henoch* пурпуре (фокални пролиферативни сегментни гломеруларни пролиферитис) и брзо прогресивни полумесечасте гломерулонефритис) (123–125). Бубрежна фиброза је типична завршна фаза инфламације која се јавља код скоро свих нефропатија (126). Фиброза може да захвати све регије бубрега, што на крају изазива деструкцију бубрежног паренхима и доводи до TFR1 (127). Локални и системски поремећаји транспорта кисеоника са формирањем хипоксије су чести узроци склерозе бубрега (128).

Многи системски фактори погоршавају прогресивну реналну инсуфицијенцију механизмима зачараних патогенетских циклуса (104,111,112,129–131) и укључују следеће:

- тровање организма нефротоксинима (разни средњи молекули, деривати фенола и индола, хомоцистеин и други молекули);
- вишак у крви потенцијално токсичних лекова растворљивих у води;
- хипопротеинемија, хиперлипидемија, хиперфосфатемија, хиперкалемија, хипонатремија, хиперурикемија и метаболичка ацидоза;
- хипертензија, убрзан развој атеросклерозе и срчане инсуфицијенције и брза прогресија дијабетес мелитуса (са дијабетичком бубрежном болешћу);
- анемија (смањена производња еритропоетина и апсорпција гвожђа (132,133));
- тромбофилија и тромбоцитопатија;
- системски проинфламаторни процеси;
- дисфункција RAAS, као и других неуроендокриних дисфункције.

Уремија на системском нивоу се одликује дисфункцијом имунског система, која доводи до инфективних компликација (134), укључујући убрзано старење тимуса и других лимфоидних органа и ослабљен стечени имунски одговор (135,136). Повећање системских проинфламаторних процеса такође је обележје овог поремећаја, који је повезан са превременим старењем (137). Поремећаји бубрежне и системске микроциркулације, као и значајно смањење густине микроваскуларних крвних судова, уобичајене су абнормалности у току HRI (138). Као резултат ових промена у контексту TFR1, други органи почињу да отказују, укључујући прогресију кардиоваскуларних и цереброваскуларних болести, атрофију мишића и кахексију (138). Патолошке промене у ендотелу (ендотелиоза) су примарни извор системске микроваскуларне патологије у TFR1, што захтева опште стратегије лечења које се примењују код многих кардиоваскуларних и бубрежних болести (139). Метаболичке абнормалности у TFR1 захтевају исте концепте лечења као и друге болести, као што је употреба статина (140).

Међусобни негативан утицај оштећене бубрежне функције и KVB може довести до кардиореналног синдрома (141–143). Морбидна гојазност и метаболички синдром, који могу довести до дијабетес мелитуса типа 2, уобичајени су сателити кардиореналног синдрома у овом сценарију (114,145). Код HRI, абнормалности у другим органима, као што су плућа (145) и мозак (146), такође доприносе упорној дисфункцији ових органа. Штавише, чак и након узимања у обзир ефеката старости, дијабетеса и депресије, појединци са дијабетичном бубрежном болешћу повезаном са TFR1 имају фенотип убрзаног старења мозга (147). Као резултат тога, значајна повреда неких органа, као што је јетра код хепатореналног синдрома, може довести до секундарног оштећења бубрежне функције, што на крају доводи до тешког затајења бубрега (148–150).

Нема сумње да рецептори за препознавање образаца (енгл. *pattern recognition receptors*, PRRs) играју кључну патогенетску улогу у локалним и системским поремећајима повезаним са TFR1 (151). Њихови лиганди су конзервативне микробне структуре - молекуларни обрасци повезани са патогеном (енгл. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) и молекуларни обрасци повезани са оштећењем (енгл. *damage associated molecular patterns*, DAMP). Они су способни да активирају ћелије имунског система, као и ендотелиоците и тромбоците, изазивајући у њима проинфламаторни ћелијски стрес (152). Категорија DAMP укључује не само многе производе разарања ткива, већ и неке уремичне токсине, укључујући мокраћну киселину (153). Акумулација повишених концентрација PAMP у крви код пацијената са TFR1 може, заузврат, бити повезана не само са инфекцијом већ и са оштећеном микробиотом и функцијом цревне баријере за транслокацију PAMP (154–156). Истовремено, локалне и системске манифестације инфламаторних реакција су типични узроци развоја HRI и њене прогресије у TFR1. Тренутно постоје три „велика“ општа патолошка процеса повезана са запаљењем: (1) системска/локална хронична инфламација ниског степена (енгл. *systemic/local chronic low-grade inflammation*, ChLGI); (2) локалне и системске манифестације запаљења класичног (канонског) типа; (3) системска инфламација, која је критична за живот пацијената (152]. Карактеристике ових процеса су различити односи према тежини и преваленцији проинфламаторног стреса ткива.

### **1.8. Патогенетски значај системске/локалне хронична инфламације ниског степена у настанку TFR1**

Тренутно, најубедљивији доказ о улози ChLGI у развоју HRI до TFR1 потиче од дијабетичне бубрежне болести. Ову патологију карактеришу и хемодинамске (хиперфилтрација) и структурне абнормалности (гломерулосклероза, интерстицијална фиброза). oxLDL и крајњи производи гликације (енгл. *glycation end products*, AGEs) и главни рецептор за њихово везивање, односно SR-J1 (RAGE), могу играти значајну улогу у патолошкој активацији мезангијских макрофага и подоцита, а гликација колагена базалне мембране је један од кључних механизма дисфункције гломеруларних капилара и суседних подоцита (157). Развој нефропатије је такође олакшан ектопичним таложењем липида у бубрезима, вишком слободних масних киселина (енгл. *free fatty acids*, FFA), и активацијом рецептора чистача SR-B2 (CD36) (158). Широки спектар лиганата, укључујући AGE, FFA, и oxLDL, активирају овај рецептор (159). Као што је познато, транспортер зависан од инсулина, GLUT4, не посредује у транспорту глукозе у ендотелне ћелије. Стога, код дијабетеса и хипергликемије унутар ових ћелија, акумулација глукозе, сорбитола и других метаболита глукозе је такође фактор ендотелиозе (160).

Чак и са умереном, али стабилном хипергликемијом код дијабетес мелитуса типа 2, може доћи до патолошке акумулације AGE у крви и других аберантних метаболита, неких DAMP-а, укључујући HMGB1 (протеин групе високе покретљивости B1), и пораста у крви проинфламаторних цитокина (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6), што је праћено проинфламаторном активацијом мезангијалних макрофага и других ћелија (161). Истовремено, са брзо напредујућом дијабетичном болешћу бубрега у крви, постоји значајна акумулација (161,162):

- проинфламаторних цитокина и активираних макрофага и IL-18 (такође се акумулира у урину);

- солубилних форми рецептора TNF (sTNFR1 и sTNFR2);
- растворљивих форми ендотелних адхезионих рецептора (sICAM-1/CD54 и sVCAM-1/CD106);
- реактивних врста кисеоника (енгл. *Reactive oxygen species*, ROS), oxLDL, AGE и других биомаркери системског ChLGI.

Фактори системског инфламаторног одговора (енгл. *Systemic inflammatory response*, SIR) су, заузврат, укључени у поремећаје различитих метаболичких процеса. Конкретно, IL-6 ремети метаболизам гвожђа, што је додатни механизам анемије код TFR1 (88). У основи системске ChLGI, многи аберантни метаболити, проинфламаторни цитокини и фактори слични цитокинима екстрареналних ткива могу утицати на развој HRI. Конкретно, многи липокини (адипокини) масног ткива могу се приписати овим факторима код дијабетес мелитуса типа 2. Истовремено, ниво адипонектина у крви може бити добар предиктор дијабетичне болести бубрега (164), и критичних компликација HRI различитог порекла (165).

Ове системске промене су карактеристичне и за дијабетес мелитус тип 1 и типа 2. Међутим, код дијабетес мелитуса типа 2, структурне абнормалности у бубрезима су хетерогеније и мање корелирају са клиничким манифестацијама (166). Све у свему, око 30–40% пацијената са дијабетесом развија нефропатију, а ово оштећење бубрега обично напредује код око једне трећине пацијената (167). Услови за развој дијабетичне болести бубрега су многи фактори ризика, укључујући генетску предиспозицију за индуцибилне гене ћелијског стреса, на пример, полиморфизам гена који кодирају *HSP70* (168).

Морфолошке промене у бубрежним телашцима, као што су задебљање базалних мембрана бубрежних гломерула, мезангијална експанзија и хипертрофија уз губитак подоцита, склерозу већег броја гломерула и ексудативно оштећење са развојем мезангиоллизе, су типичне манифестације дијабетичне болести бубрега (депозиције фибрина) (157,169). Могу се открити и интерстицијска фиброза и тубуларна атрофија у бубрежној медули, хијалиноза артериола и артериосклероза, проширење субендотелног простора и неоваскуларизација (169). Ове промене имају индивидуалне знакове карактеристичне за жариште класичне инфламације (на пример, интерстицијални фибринозни едем) и, у неким случајевима, праћене су укључивањем мигрирајућих леукоцита, укључујући Т и Б лимфоците у процес (167, 169–171). Као резултат тога, патогенезу дијабетичне болести бубрега карактеришу не само метаболичке абнормалности већ и вишеструки имунолошки и инфламаторни механизми (171,172), што чини изазовом разликовање ChLGI и традиционалних инфламаторних процеса у патологији TFR1.

Карактеристични знаци реналне фиброзе су развој ћелијског и ткивног проинфламаторног стреса у бубрезима, укључујући оксидативни стрес, формирање инфлазома и фактора проинфламаторног секреторног фенотипа (173,174). Дакле, без обзира на прецизан узрочни механизам или локализацију процеса, универзални ефекат цитокина и других медијатора различитих бубрежних ћелија на развој бубрежне фиброзе показан је код људи и животиња (39, 175–178, 179), као што је наведено у наставку.

- ангиотензин II (Ang-II), ET-1, аденозин (ADO), ROS;
- трансформишући фактор раста- $\beta$  (TGF- $\beta$ );
- фактори раста тромбоцита (PDGF), везивног ткива (CTGF) и фибробласта-23 (FGF-23);

- хемокини: моноцитни хемоатрактантни протеин-1 (MCP-1, CCL2) и фактор стромалних ћелија-1 (SDF-1, CXCL12);
- цитокини: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-11, IL-18, и IL-20;
- молекула оштећења бубрега-1 (енгл. *kidney damage molecule-1*, KIM-1);
- директне међућелијске контактне интеракције рецептора породице *Notch* и *Notch* лигананда укључених у ЕМТ.

Неколико од ових фактора могу деловати као бубрежни токсини. Истовремено, повећање метаболичких цитокина у крви, FGF-23, који је укључен у регулацију циркулишућих нивоа фосфата и витамина Д, је поуздан прогностички маркер за процену ризика и неповољних исхода TFR1 (180,181). Чак и пре појаве очигледних знакова класичне инфламације, може се приметити укључивање мастоцита у процес реналне фиброзе код рефлуксне нефропатије (182) и амилоидозе бубрега (183). У многим аспектима, ћелијска апоптоза, паренхимска дистрофија и ренална фиброза су повезани са хемодинамским поремећајима услед смањене засићености и хипоксије, који иницирају следеће (178):

- оксидативни стрес;
- многе сигналне путеве ћелијског стреса, укључујући *Notch*, *MARK*, *PKC*, *PI3K/Akt/mTOR*, и *AMPK*;
- активацију кључних фактора транскрипције ћелијског стреса: нуклеарни фактор капа бета (*NF- $\kappa$ B*), *AP-1*, и индуцибилни фактор хипоксије (енгл. *hypoxia inducible factor*, *HIF*);
- дејство многих регулаторних miRNAs.

Генерално, развој реналне фиброзе и TFR1 зависи од степена системских и локалних хомеостатских и проинфламаторних промена у бубрезима, поред дисфункција других органа, на пример, код кардиореналног синдрома (141–143). Такође је доказан значај локалних манифестација ChLGI у формирању и аутозомно доминантне и аутозомно рецесивне полицистичне болести бубрега (184). Интерстицијална инфламација је у овим случајевима повезана са формирањем циста, као и фиброзе. Штавише, индикатори инфламације и инфилтрације бубрежног интерстицијума макрофагима појављују се много пре него што се утврди формирање цисте, а они су повезани са прогресијом болести.

Важно је напоменути да дијабетична болест бубрега ствара зачарани патогенетски циклус јер HRI доприноси развоју системске ChLGI, инсулинској резистенцији и формирању метаболичког синдрома код људи (185). За почетак, развој системског проинфламаторног стреса ткива промовише присуство TFR1 и PH услед вишеструких извора инфламаторних стимулуса, као што су оксидативни стрес, ацидоза и хиперволемија, повећан коморбидитет, укључујући инфекције, процедуре дијализе, продукцију, и неадекватно уклањање (недовољан клиренс) проинфламаторних цитокина (186). Ове промене у PH су повезане са недовољно ефикасном филтрацијом цитокина и других молекула тежине 15–45 kDa, активацијом леукоцита и система хемостаза плазме, комплемента и каликреин-кинина током интеракције крви са мембранама за дијализу, цикличним флукуацијама запремине крви и нивоима електролита, и осмотским променама (187–189). Уремија, као уобичајена карика у патофизиологији TFR1, изазива стрес у масном ткиву и скелетним мишићима, повећавајући инсулинску резистенцију и индукујући развој SIR-а у факултативно гликозилирајућим органима (190).

Дакле, у позадини системске ChLGI, прогресија HRI до TFRI је резултат сложене интеракције локалних и системских генетских, онтогенетских и еколошких варијабли, као и метаболичких и имунолошких компоненти. Као резултат тога, TFRI убрзава настанак системских процеса који су неповољни за пацијенте. Разноврсност и пропорција проинфламаторних механизма одређују патогенезу специфичних варијанти HRI.

### 1.9. Типични обрасци класичне инфламације код HRI и TFRI

Као што је раније речено, формирање фокуса, који ограничава захваћено подручје, је основни знак канонске инфламације. Мигрирајући у зоне инфламације леукоцити и макрофаги, који се формирају из моноцита, врше кључну (у случају хроничности) проинфламаторну функцију у жаришту инфламације. Према доминацији једног или другог патогенетског механизма и ћелијском саставу класичне инфламације, могу се разликовати следеће врсте:

- ексудативно-васкуларно катарално и серозно запаљење (са израженијом ексудацијом у серозним ткивима);
- продуктивно (пролиферативно) запаљење, са превлашћу ћелијске инфилтрације одређеног састава у зависности од природе фактора оштећења и фазе процеса;
- ексудативно-деструктивно запаљење (гнојно, фибринозно и гангренозно);
- мешовито запаљење са немогућношћу јасног дефинисања врсте запаљења.

Међусобна интеракција адаптивног и урођеног имунитета је кључна у развоју запаљења. Макрофаги су најважније ћелије урођеног имунитета. Макрофаги могу да се активирају и поларизују у два главна компетитивна правца током развоја инфламације: класични облик активације и диференцијације -M1 и алтернативни -M2 макрофаги (191). Ови типови макрофага ступају у кооперативне односе са CD4+ Т помоћничким лимфоцитима типа 1 (енгл. *CD4+T helper type 1 lymphocyte*, Th1), који су кључни у производњи интерферона-гама (IFN- $\gamma$ ), или са Th2 (IL-4, IL-5, и IL-13) лимфоцитима (191,192). Поред тога, неке M2 субпопулације сарађују са Th17 (IL-17A/F, IL-21, IL-22, и TNF- $\alpha$ ) и Т-регулаторним ћелијама-Treg (IL-10 и TGF- $\beta$ ) (191,192). Диференцијација макрофага је пластична и најпре се може говорити о њиховом морфофункционалном помаку у опсегу M1 у M2 макрофаге (120,121). У овом случају, динамика у правцу M2 до M1 макрофага обично указује на повећање оштећења и запаљење, док је фиброза индикована у супротном смеру [152]. Диференцијација је такође пластична, а под дејством цитокина и других стимулуса може доћи до репрограмирања Th1 из једне субпопулације у другу и формирање ћелија са мешовитим фенотипом и функцијом (195–198). Диференцијацију стромалних макрофага, укључујући и током развоја ChLGI, такође карактерише морфофункционални помак M1 у M2 макрофаге, где метаболички фактори и рецептори чистачи (енгл. *Scavenger receptors*) ових ћелија играју значајнију улогу (199).

У поједностављеном облику, инфламаторни макрофаги се могу поделити у четири подгрупе, од којих свака сарађује са субпопулацијама CD4+ Т ћелија које имају проинфламаторне функције и на тај начин формирају четири вектора имунског одговора (i1, i2, i3, и i-reg), од којих сваки покреће прогресију инфламације у одређеном правцу (192). Истовремено, вишеструки вектори имунолошке реактивности



могу имати функционалне зоне преклапања и манифестовати се у различитим односима у жаришту инфламације.

### 1.10. Системски инфламаторни процеси у TFRI

SIR је очигледан знак системске промене и може се дефинисати као акумулација продуката ткивног проинфламаторног одговора. Развој SIR-а може бити пратилац различитих процеса, укључујући системски ChLGI, класичну инфламацију (генерализација инфламаторних медијатора из жаришта инфламације) и саму хроничну системску инфламацију (енгл. *chronic systemic inflammation*, ChSI) као општи патолошки процес. Акутна системска инфламација је повезана са феноменом системске инфламаторне микроциркулације и микроциркулацијским поремећајима који су животно угрожавајући (200). Различити синдроми реанимације са формалним протоколима одражавају акутну системску инфламацију клинички, што олакшава формализовање критеријума за њену верификацију (200,201). Међутим, код хроничних патологија, микроциркулацијски поремећаји се одвијају латентно. Ово отежава одвајање ChSI од других варијанти SIR-а, чак и с обзиром на тежину општег стања пацијената са TFRI. Прекомерна пермеабилност микроваскулатуре, посткапиларна микротромбоза, дилатација артериола и капиларних сфинктера су повезани са акутним поремећајем перфузије ткива, док је ChSI повезана са постепеним смањењем густине микроваскуларне мреже, вазоконстрикциом артериола, често компликованом хипертензијом, атеросклерозом артериола и великом артеријском стенозом (138). Када се упореди са акутном системском инфламацијом, ChSI се може сматрати продуженим стадијумом предсистемске инфламације.

### 1.11. Карактеристике развоја SIR-а у TFRI

Тренутно се може идентификовати неколико маркера SIR-а, чија је концентрација у крви снажно повезана са динамиком HRI. Ови фактори укључују акумулацију следећих фактора у крви (202–210):

- разни ROS;
- проинфламаторни цитокини: TNF- $\alpha$ , IL-6, и IL-18;
- хемокини: IL-8 (CXCL8), IL-34, SDF1 $\alpha$  (CXCL12), MCP-1 (CCL2), и MIP-1 $\beta$  (CCL4);
- фактори раста: фактор стимулације колоније гранулоцита-макрофага (енгл. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), FGF-23, и фактор раста хепатоцита (енгл. *hepatocyte growth factor*, HGF);
- солубилне форме рецептора: sTNFR1 и sTNFR2, sCD40L, и sCD163 (SR-I3);
- циклофилин А као индуктор проинфламаторних цитокина (211).

Протеин сличан ангиопоетину 2 (енгл. *angiopoietin-like protein 2*, ANGPTL2), ендокан, тромбомодулин и солубилне форме рецептора васкуларног ендотелног фактора раста 1 и 2 (sVEJGF1/2) су маркери ендотелне дисфункције (202,212–214). Фактори SIR-а су укључени у етиологију TFRI код пацијената на хемодијализи (215] и код особа са хроничном дисфункцијом алографта (216). Истовремено, изгледа да на озбиљност SIR-а код пацијената на хемодијализи не утиче првобитна болест- дијабетична бубрежна

болест, хронични примарни гломерулонефритис или пијелонефритис (217). Недавним испитивањима крвне плазме код пацијената са TFRI откривено је следеће (218):

- вишеструко повећање просечних и средњих вредности TNF- $\alpha$ , IL-8 и солубилне форме IL-2 рецептора (sCD25);
- мање значајне (приближно двоструко веће вредности) промене у вредностима CRP, IL-6 и TGF- $\beta$ 1;
- у исто време, концентрација анти-инфламаторног IL-10 се није значајно разликовала од његовог нивоа у крви здравих људи.

Засебна област процене SIR-а код TFRI је одређивање екстрацелуларних везикула (ЕВ) у крви (219,220). Штавише, ЕВ могу побољшати коагулацију крви због својих моћних прокоагулантних ефеката; стога, процена ЕВ може бити корисна за предвиђање компликација TFRI (219–221).

### **1.12. Системски инфламаторни феномени специфични за TFRI**

Као што је раније речено, постоји неколико разлога за развој феномена системског оштећења -покретача за развој ChSI -са различитим облицима развоја TFRI. Генерално, ова појава је мање изражена код хроничних болести него код акутних критичних стања. Међутим, чак и код TFRI, постоји константан и значајан пораст нивоа миоглобина у крви (218), као и тропонина I и T специфичних за миокард код неких пацијената (215,216,222). У међувремену, код TFRI, одређивање аминотрансфераза изгледа мање корисно за потврђивање системских болести (223). Развој саркопеније и кахексије код TFRI је и последица и узрок системских болести (138,224,225). Ове болести су узроковане међусобно повезаним аномалијама метаболичке активности скелетних мишића, јетре и масног ткива, а карактеришу их поремећаји у метаболичким циклусима и акумулација липотоксичних фактора у крви (152).

Кључни атрибут било које врсте системске инфламације, као општег патолошког процеса је феномен системске инфламаторне микроциркулације. Током TFRI, према методама за процену микроциркулаторних поремећаја, открива се значајно слабљење микроциркулацијске резерве у интегументарним ткивима и унутрашњим органима, што је у корелацији са повећањем нивоа креатинина у крви и степеном смањења JGF (138,226–228). Поремећаји микроваскуларне (ендотелне) функције, заузврат, играју значајну улогу у прогресији кардиоваскуларних и бубрежних болести (229–231). Према сублингвалној латералној микроскопији тамног поља, степен микроциркулаторних поремећаја код пацијената са TFRI може значајно да се смањи након успешне трансплантације бубрега (231). Међутим, поремећај (оштећење) микроваскуларног крвотока не мора да се одрази на промене у макрохемодинамици (230).

Развој микротромба или, иначе, дисеминоване интраваскуларне коагулације (енгл. *Disseminated intravascular coagulation*, DIC) је један од знакова системског микроциркулаторног поремећаја. Симптоми DIC-а су обично латентни код хроничних пацијената са системским микроциркулаторним поремећајима и не одговарају критеријумима за реанимацију у случајевима DIC синдрома. Поремећаји хемостатског система током уремије, с друге стране, могу играти значајну улогу у васкуларним компликацијама, манифестујући се повећањем нивоа фибриногена (протеина акутне фазе) у крви и активацијом маркера DIC-а, као што су растворљиви фибрин мономерни

комплекси и Д-димер (232,233). У међувремену, протромботичке промене се могу видети код пацијената са TFR1 чак и када је присутна секундарна тромбоцитопатија, што је један од узрока хеморагијске дијатезе (234). Као резултат тога, праћење хемостатских промена код пацијената на хемодијализи је кључно за примену одговарајућих режима антикоагулантне терапије у одговарајућем временском интервалу. Интраваскуларна паракоагулација и контакт крви са страном површином током извођења РН, промовишу активацију комплемента и акумулацију анафилатоксина C3a и C5a у крви, што додатно доприноси активацији интраваскуларних леукоцита, ендотелних ћелија и периваскуларних мастоцита (235–237).

Периваскуларни мастоцити су директни учесници у инфламаторним реакцијама малих крвних судова. Тешки пруритус је један од симптома TFR1-а који утиче на квалитет живота и повезан је са лошим исходима код пацијената на хемодијализи (238). Пролиферација и активација мастоцита у дермису може бити један од узрока свраба (238,239). Поред тога, уремијски пруритус код пацијената на хемодијализи је повезан са повећањем нивоа i2 цитокина у крви (IL-13 и IL-31) повезаних са активношћу мастоцита [240]. Истовремено, након трансплантације бубрега, повећан број мастоцита у ткивима код особа са TFR1 се може вратити у нормалу (241). Ниво триптазе у крви одражава степен системске патогене активације мастоцита у TFR1 (242). Код TFR1, нивои триптазе, TGF- $\beta$  и IL-6 у крви су у позитивној корелацији са степеном венске хиперплазије интима и стварањем венске неоинтималне хиперплазије (243). Примећено је да производња IL-9 и дегранулација мастоцита промовишу неоинтималну хиперплазију и спречавају поновну ендотелизацију вене трансплантиране мишевима са нефректомијом у моделу HRI у узнапредовалом стадијуму (244). Ови налази имплицирају да IL-9 и мастоцити могу играти улогу у патофизиологији инсуфицијенције фистуле узроковане неоинтималном венском хиперплазијом.

Значајан фактор ризика за кардиоваскуларне компликације код TFR1 је системска активација фактора урођеног имунитета: комплемента, фагоцитних леукоцита и макрофага (245). Генерално, TFR1 карактерише поремећена активација и дисфункција система мононуклеарних фагоцита, укључујући крвне моноците и дендритске ћелије, што је један од фактора промена у васкуларном систему и дисфункције имунског система [246]. Патолошка активација неутрофила са акумулацијом протеиназа које оштећују ткиво, катјонских протеина и ROS у крви је такође неопходна за развој системске интраваскуларне инфламације (247). Поред тога, формирање неутрофилних екстрацелуларних замки (енгл. *neutrophil extracellular traps*, NETs) у интраваскуларном окружењу је механизам оштећења ткива и очигледан фактор ризика за кардиоваскуларне компликације код пацијената са TFR1 (248). Ова варијанта програмиране некрозе неутрофила и других фагоцита је означена као NET-оза. Конкретно, током хемодијализе, NET-оза неутрофила је праћена ослобађањем мијелопероксидазе, еластазе и других флогогених фактора у крвоток (249,250).

Штавише, код TFR1, примећује се интраваскуларна активација еозинофила, о чему сведочи пораст еозинофилног катјонског протеина у крви (енгл. *eosinophilic cationic protein*, ECP), фактора промене ткива (218,251). Дистресна реакција хипоталамус-хипофизно-надбубрежног система је универзална манифестација многих тешких обољења људи, али је посебно изражена у развоју системске инфламације. Пацијенти са TFR1 доживљавају значајно повећање нивоа кортизола у плазми (218,252,253).

Дуготрајно лечење хемодијализом, с друге стране, може открити знаке надбубрежне инсуфицијенције, укључујући артеријску хипотензију (254) и, у неким околностима, чак и опонашати Аддисонову болест (255). Дакле, TFR1 на нивоу система открива низ не само квантитативних већ и квалитативних промена које превазилазе концепт системског ChLGI, а које пре одговарају другом општем патолошком процесу - ChSI.

### 1.13. Породица лектина

Термин „лектин“ потиче од латинске речи „*legere*“ што значи „сакупити“ и дефинише групу везујућих протеина који ступају у интеракцију са више молекула преко специфичног домена за препознавање угљених хидрата (енгл. *carbohydrate recognition domain*, CRD) (256). Због ових интеракција, лектини су укључени у широк спектар сигналних путева (нпр. од пута трансдукције до интеракције између ћелије) (257,258). Галектини су 14-члане породице протеина унутар лектина који везују  $\beta$ -галактозу преко свог специфичног CRD. Галектини су подељени у три групе, у зависности од њихових CRD и структуре протеина: галектини 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 15 и 16 се састоје од једног од два различита уједињена CRD; а Gal-3 је химерни протеин који укључује један CRD и један регулаторни N-терминални домен повезан са секвенцом сличном колагену (259). Галектини су укључени у различите биолошке процесе као што су рани развој, миграција ћелија, имунолошка сигнализација која доводи до профибротичких ефеката (260–262) и комуникације са ћелијом (263).

### 1.14. Gal-3

Gal-3 је једини галектин откривен посебно код сисара и много пута је преименован (Mac-2 антиген, IgE-везујући протеин, протеин који везује угљене хидрате и L-29) (264–266). То је растворљиви протеин састављен од 3 различита домена: CRD, секвенце сличне колагену и специфичног терминалног домена N-линка (267-270).

- CRD је угљени хидрат који везује полипептидни домен. CRD Gal-3 реагује са различитим протеинима који садрже угљене хидрате, активирајући различите сигналне путеве (271).
- Секвенца слична колагену повезује CRD са N доменом и састоји се од девет колагенских секвенци (домен богат пролином/глицином) које се могу раздвајати матриксном металопроотеазом (272).
- N-линк домен: неопходан је за биолошку активност Gal-3. Овај домен има два места где су серини фосфорилисани (273). Биохемијске модификације овог домена доводе до интернализације Gal-3 у ћелије језгра (5).
- У ванћелијском окружењу, Gal-3 препознаје различите структуре гликана, способан је да везује специфичне  $\beta$ -галактозиде и да формира мултимере, да умрежи гликокоњугате и да формира решетке (Слика 1). Аглутинација Gal-3 и агрегација са лигандима се дешава при ниским концентрацијама, док је у физиолошким и високим концентрацијама Gal-3 у облику мономера (274).

## Структура Gal-3



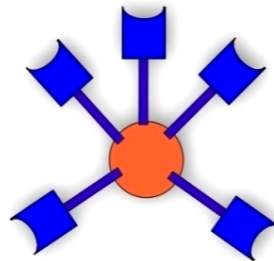
COOH домен за препознавање угљених хидрата



домен сличан колагену  $\alpha$

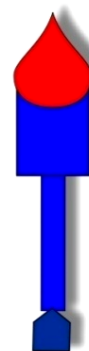


NH2 домен



олигомер

Gal-3 лиганд



мономер

**Слика 1. Структура Gal-3. Шематски приказ Gal-3 мономера и олигомеризације Gal-3.** Gal-3 химерна структура коју карактерише домен за препознавање угљених хидрата и N-терминални не-лектински домен који промовише олигомеризацију, омогућавајући формирање олигомера. (кориговано према: Blanda V. Int J Mol Sci. 2020;21:9232).

### **1.15. Експресија и улога Gal-3**

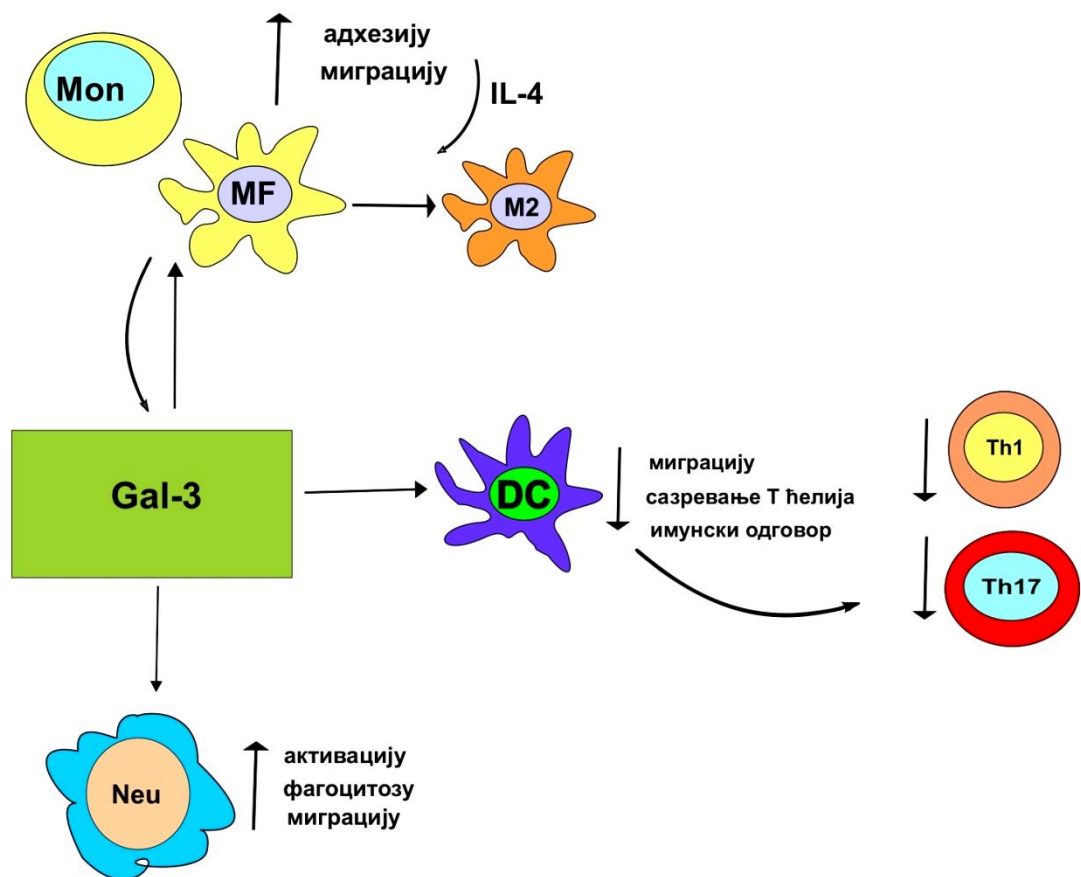
Више органа (тј. плућа, слезина, стомак, дебело црево, надбубрежне жлезде, материца, јајници и бубрези) и различите ћелије (тј. инфламаторне, ендотелне, мишићне или туморске ћелије и фибробласти) експримирају Gal-3, што резултује његовим различитим улогама у различитим патофизиолошким стањима (275,276,277). Унутар ћелије, Gal-3 се формира у цитоплазми и промовише опстанак ћелије путем регулације апоптозе (278). Такође се може интернализovati у језгро како би се промовисала пролиферација ћелија (279). Gal-3 се налази у плазматској мембрани ћелија где може да модулише интеракцију између епителних ћелија и ЕСМ или са другим ћелијама (280). Његова способност да се везује за интегрине или ендотелне адхезивне протеине омогућава адхезију са другим ћелијама или промоцију активације ћелијских веза (281-284). Gal-3 се такође може везати са гликопротеинима како би промовисао везивање ЕСМ (280,285) и створио мост између Gal-3 и ћелија (286). Сви ови механизми промовишу каскаду трансдукције са мембранских на интраћелијске путеве (5,287-290). Gal-3 се такође лучи у плазми, или у организмима у солубилном облику, током специфичног оштећења, и делује као DAMP како би промовисао имунски одговор (291,292). Многе студије наводе да Gal-3 има профибротичку улогу у бубрезима и плућима путем имунолошки посредоване модулације инфилтрације макрофага (293-295). Експресија Gal-3 може бити интрацелуларна, на ћелијској мембрани, или у растворљивом облику, ван ћелије.

### **1.16. Инхибитори Gal-3**

Генетска и фармаколошка инхибиција Gal-3 је истраживана како би се проценио његов патофизиолошки утицај након повреде. Пошто се овај лектин везује за више ћелијских места, способности екстрацелуларне фиксације и пермеабилности су кључне за инхибиторе Gal-3, који су класификовани према карактеристикама везивања за угљене хидрате (291,296). Међутим, нека испитивања која процењују инхибиторе Gal-3 остају некомплетна у свом приступу и релевантности. У овом случају, употреба инхибитора Gal-3 у клиничким тестовима има ограничену ефикасност.

### **1.17. Интеракције Gal-3 са ћелијама имунског система**

Gal-3 делује проинфламаторно у оквиру урођене имуности, тако што у својим антимикробним и регенеративним дејством утиче на моноците, макрофаге, неутрофиле и дендритске ћелије и модулира њихову активност (Слика 2). Такође, Gal-3 може да интерреагује и самим патогенима (292,298)



**Слика 2. Интеракције Gal-3 са ћелијама имунског система.** Gal-3 утиче на моноците, макрофаге, неутрофиле и дендритске ћелије и модулира њихову активност. DC-дендритске ћелије, Neu-неутрофиле, Mon-моноцити, MF-макрофаги, M2- алтернативни тип макрофага

### 1.18. Gal-3 и моноцитно/макрофагна лоза

Gal-3 делује као хемоатрактант за моноците и макрофаге као њихове прекурсоре (Слика 2). Макрофаги луче Gal-3 приликом уласка калцијума у ћелије и на тај начин активира рецепторе за G протеин осетљив на активацију пертузис токсином (енгл. *pertussis toxin*, PTX) (298). Gal-3 се такође експримира на моноцитима, а експресија је још израженија након диференцијације у макрофаге. Није утврђено на који тачно рецептор за хемоатрактант Gal-3 реагује. Такође, укрштено повезивање са CD11b и CD98 може да повећа адхезију и миграцију моноцита. Уз то, фактор активације тромбоцита (енгл. *Platelet-activating factor*, PAF), N-Formylmethionyl-leucyl-

phenylalanine (fMLP), леукотријени и C5a као хемоатрактанти, стимулишу дејство Gal-3 (298).

Gal-3 препознаје рецепторе на макрофагима (CD11b, LAMP1 и 2, Mac-3, и CD98). У мозгу, Gal-3 се везује за макрофаге преко лиганда за рецепторе сличних Толу 4 (енгл. *Toll-like receptor 4*, TLR4). Gal-3 уз лучење IL-4 усмерава макрофаге ка M2 типу макрофага и на тај начин делује анти-инфламаторно. У појединим истраживањима је приказано да Gal-3 *knockout* мишеви, показују слабију реакцију на IL-4 и слабије усмерење ка M2 фенотипу макрофага. На овај начин може да се регулише имунски одговор и смањи имунски посредовано оштећење ткива и органа (292, 298).

### 1.19. Gal-3 и неутрофили

Gal-3 делује као хемоатрактант и активатор за неутрофиле (Слика 2). Излучује се аутокринно и паракринно. Неутрофили први стижу на место инфекције, где врше фагоцитозу и показују бактерицидну активност, док њихова прекомерно активација може да оштети ткиво. Егзогени Gal-3 везује наивне и зреле неутрофиле, преко C- терминалног CRD краја и N- терминалног нелектинског домена, индукујући тако њихову активацију. Након екстравазације, Gal-3 у неутрофиле активира NADPH оксидазу. Излучени Gal-3 функционише као рецептор за препознавање образаца (енгл. *pattern-recognition receptor* PRP). Gal-3 може да изазове миграцију неутрофила и као део DAMP-а. На крају, уклања неутрофиле, делујући као опсонин за фагоцитозу од стране макрофага. Интересантно је да код хроничне опструктивне болести плућа (ХОБП) постоји повећање Gal-3 и неутрофила. (298, 299)

### 1.20. Gal-3 и дендритске ћелије

Дендритске ћелије (енгл. *Dendritic cells*, DCs) презентују антигене на својој површини и секретују цитокине, који усмеравају наивне Т ћелије ка матурацији у Th1, Th2 или Th17 лимфоците (Слика 2). Gal-3 се везује за протеине ЕСМ-а, реакцијом са DCs, спречава њихову миграцију у периферне лимфне органе, што спречава сазревање Т ћелија, а тиме и имунолошку реакцију. DCs Gal-3 *knockout* мишева луче више IL-12, што индукује Th1 одговор. Код хистоплазмозе Gal-3 *knockout* мишева, DCs луче IL-23 или IL-17, што указује на њихову поларизацију ка Th17 одговору. Gal-3 регулише лучење проинфламаторних цитокина IL-6 и IL-1 $\beta$  и лучење IL-10 и IL-12p35 у хуманим DCs изведеним из моноцита (MoDCs) стимулираних TLR лигандима, међу којима је и LPS (292, 298).

### 1.21. Антимикробно дејство Gal-3

Gal-3 везује LPS, који се налази у зиду Грам негативних бактерија, и тако спречава ендотоксични шок. Gal-3 је део DAMP реакције на сепсу коју изазива бактерија *Franciscella novicida*, због индукције инфилтрације неутрофила и других цитокина на месту васкуларне повреде. *Toxoplasma gondii* изазива повећање Gal-3 у леукоцитима који инфилтрирају плућа, јетру и мозак. *Helicobacter pylori* повећава концентрацију Gal-3 у ћелијама желудачне слuzнице. *Neisseria meningitidis* повећава концентрацију Gal-3 (292). Gal-3 се може наћи у туберкулоидним лезијама и код особа са лепроматозном лепром. Gal-3 повећава лучење IL-10 од стране моноцита стимулираних



TLR2/1 лигандом и смањује им способност да се диференцирају у DCs, што доводи до слабљења стеченог T ћелијског одговора (292, 298). Утврђено је да Gal-3 везује LPS из *Escherichie coli* и *Pseudomonas aeruginose*, било преко CRD домена са  $\beta$  галактозидом, било преко N- терминалног домена. То за последицу има олигомеризацију Gal-3 а тиме и миграцију неутрофила (292, 299).

## 1.22. Gal-3 и инфламаторни имунски одговор

Инфламаторне реакције генерално, имају заштитну улогу и служе за одржавање хомеостазе ткива, и ако не постоји адекватна контрола инфламаторних реакција, постају штетне за домаћина. У скоро свим случајевима, основни узрок оштећења ткива је накупљање леукоцита. Регрутовање леукоцита у хомеостатским и инфламаторним зонама је високо регулисан процес који захтева специфичне и секвенцијалне молекуларне интеракције између леукоцита и васкуларног ендотела. Увид у ћелијске и молекуларне процесе укључене у сваки корак каскаде дат је низом експерименталних приступа изведених *in vitro* и *in vivo*. Ово укључује студије инхибиције антитела, статичке адхезионе тестове, као и коришћење интравиталне микроскопије малих животиња да би се визуелизовала жива интеракција леукоцита са зидом крвног суда. Ове студије су помогле да се разјасни 1) да су почетне интеракције леукоцита и ендотела (хватање и котрљање) подстакнуте првенствено фамилијом молекула званих селектини заједно са њиховим олигосахаридним лигандима, и 2) да су чврста адхезија и трансмиграција посредоване интегринима леукоцита у интеракцији са суперфамилијом ендотелних имуноглобулина адхезионих молекула. Фаза репарације и смањења инфламације није само пасиван процес како се некада веровало, већ се активно одвија. Док постоји низ проинфламаторних медијатора иницијација запаљења, репертоар антиинфламаторних медијатора и механизма у домаћину функционише тако да промовише и контролише фазу резолуције, инхибирајући миграцију леукоцита и промовишући клиренс инфламаторних ћелија (300,301). Велики број доказа показује да галектини спадају у ову категорију имунорегулаторних медијатора, што означава њихову потенцијалну употребу као нових антиинфламаторних агенаса.

## 1.23. Деловање егзогеног Gal-3

За разлику од Gal-1, за Gal-3 се у великој мери тврдило да има про-инфламаторну улогу са својом повећаном експресијом у низу инфламаторних/имунских поремећаја, наглашавајући његову потенцијалну улогу у запаљењу. Повећани нивои Gal-3 су откривени у: течности бронхоалвеоларног лаважа (енгл. Bronchoalveolar lavage, BAL) у мишјем моделу астме изазване овалбумином (енгл. *murine model of ovalbumin-induced asthma, OVA*), при чему су макрофаги главни тип ћелија који садрже Gal-3 (302), у можданом ткиву инфицираном прионима (303), у тимусу након инфекције *Trypanosoma cruzi* (304) као и синовијалном ткиву пацијената са реуматидним артритисом (305). Нивои од чак 50 $\mu$ g/ml су откривени у BAL течности мишева након инфекције *Streptococcus pneumoniae* (306). Поред тога, експресија Gal-3 је повезана са повећаним малигнитетом код бројних тумора (307) и може бити користан маркер за одређивање стадијума одређених тумора (308). Улога Gal-3 у урођеном имунитету је подржана студијама које показују да је регрутовање неутрофила и макрофага ослабљено у *in vivo*

моделима перитонитиса спроведеним код Gal-3 *knockout* мишева (309). Ово је даље потврђено *in vitro* студијама у којима рекомбинантни Gal-3 промовише интеракције неутрофила и ендотела (310). Током инфламације Gal-3 се ослобађа у ЕСМ где може активирати инфламаторне ћелије или допринети њиховом задржавању повећањем ћелијских интеракција са гликопротеинима ЕСМ-а. У складу са проинфламаторном улогом, показало се да егзогени Gal-3 активира бројне типове ћелија укључених у инфламаторни/имунски одговор; наиме, изазива дегранулацију мастоцита (311), производњу IL-1 и супероксида у моноцитима (312), стварања супероксида и IL-8 и излучивања L-селектина у неутрофилима (306). Gal-3 повећава ћелијску експресију карциноембрионалног антигена повезаног са ћелијском адхезијом (енгл. *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1*, CEACAM1) и CEACAM8, који затим делују као рецептори за трансдукцију Gal-3 посредовану активацијом NAD(P)H оксидазне активности (313). Занимљиво је да су примирани неутрофили тада способни да деактивирају Gal-3 изазивајући његово цепање углавном преко серин протеазе еластазе (314). Осим што промовише ћелијску активацију, егзогени Gal-3 такође промовише ћелијску адхезију. Примена hr-Gal-3 промовише адхезију неутрофила за ламинин на начин завистан од угљених хидрата, независан од калцијума, док у присуству двовалентних катјона Gal-3 активира неутрофиле повећавајући њихову адхезију за друге лиганде као што је фибронектин (286). Gal-3 такође промовише адхезију неутрофила за ендотелне ћелије *in vitro* и може играти важну улогу у екстравазацији неутрофила независном од  $\beta$ -2 интегрина *in vivo* (310). Ови резултати, заједно са смањеним ћелијским инфилтратом уоченим у бројним *in vivo* моделима запаљења Gal-3 *knockout* мишева, пружају доказе о улози Gal-3 у посредовању у регрутовању леукоцита током инфламаторног одговора (314).

Када је апоптоза у питању, изгледа да Gal-3 функционише другачије у односу на своју локализацију, односно да ли је интра или екстраћелијски локализован. Интрацелуларни Gal-3 инхибира апоптозу, што онда резултира стабилношћу ћелија које се преносе циркулацијом на места запаљења. Сматра се да је инхибиција апоптозе последица локализације Gal-3 у митохондријама, који тако спречава ослобађање цитохрома c (315). Чини се да овај заштитни ефекат интрацелуларног Gal-3 функционише у бројним типовима ћелија и као одговор на широк спектар агенаса који индукују апоптозу. Прекомерна експресија Gal-3 у хуманим леукемијским Т ћелијама резултирала је отпорношћу на апоптозу индуковану anti-FAS $\alpha$  антителима и стауроспорином (287), док је прекомерна експресија Gal-3 у ћелијама карцинома дојке повећала отпорност на цисплатину и апоптозу изазвану слободним радикалима (316). Сходно томе, ћелије којима недостаје интрацелуларни Gal-3 су подложније апоптози, што је приказано повећаном апоптозом перитонеалних макрофага код Gal-3 *knockout* мишева и повећаном апоптозом изазваном ултравиолетним Б зрачењем (енгл. *Ultraviolet B radiation*, UVB) кератиноцита без Gal-3 (317), ефекат за који се сматра да је последица супресије *Erk* фосфорилације и побољшања активације *Akt* сигналног пута.

Егзогени Gal-3 индукује излагање фосфатидилсерину и апоптозу Т ћелија (318). Након инфекције рекомбинантним *T. cruzi*, Gal-3 је изазвао смрт у кортикалним незрелим тимоцитима, док тимуси Gal-3 *knockout* мишева нису показивали исцрпљење кортекса након инфекције паразитима *in vivo* (304). Третман са hr-Gal-3 ( $\geq 100$  nM за 18–44h) може индуковати апоптозу мастоцита на начин који зависи од угљених хидрата, RAGE и каспазе-3 (311). Раније студије су известиле да Gal-3, слично Gal-1, индукује излагање

фосфатидилсерина неутрофилама без изазивања апоптозе (318): у ствари *Farnworth* и сарадници (306) су открили да Gal-3 може да одложи апоптозу неутрофила. Могуће је да ове разлике могу бити последица различите концентрације и трајања третмана Gal-3 коришћеног у овим тестовима (306).

У складу са својим ефектима на ћелијску активацију и адхезију, Gal-3 такође промовише хемотаксу моноцита *in vivo* и макрофага *in vitro* (1  $\mu$ M) (319) као и еозинофила код астме изазване OVA (302). Један аспект запаљења где се чини да Gal-3 има благотворно дејство је фагоцитоза. Фагоцитоза је неопходна за уклањање патогена, страних тела и ћелијских остатака, чиме се омогућава смањење запаљења. Утврђено је да Gal-3 игра кључну улогу у фагоцитози макрофага без Gal-3 који показују смањену фагоцитозу еритроцита и тимоцита опсонизованих IgG *in vitro*; штавише, Gal-3 *knockout* мишеви показују смањену фагоцитозу еритроцита од стране Купферових ћелија у моделу хемолитичке анемије (319). Третман са хр-Gal-3 повећава фагоцитозу апоптотичких неутрофила од стране макрофага изведених из моноцита (320), и то је у сагласности са чињеницом да макрофаги без Gal-3 показују смањену фагоцитозу апоптотичких неутрофила (306). Поред повећања фагоцитозе макрофага, Gal-3 такође побољшава фагоцитне способности неутрофила, што је чињеница која делимично може објаснити заштитну улогу Gal-3 у инфекцијама као што је *S. pneumoniae* (306).

Gal-3 супримира инфламацију посредовану типом 2 имунског одговора тако што инхибира производњу IL-5 од стране еозинофила и антиген-специфичних Т-ћелијских линија, што указује на потенцијалну улогу у алергијској инфламацији (321). У складу са овим, експерименти генске терапије су показали да третман астматичних пацова плазмидом који кодира Gal-3 побољшава број еозинофила код ових животиња и смањује хиперреакцију дисајних путева на метахолин (322). Међутим, претходна студија на Gal-3 *knockout* мишевима сугерисала је проинфламаторну улогу Gal-3 са повећаним нивоима IFN- $\gamma$  и смањеним нивоима IL-4 код OVA мишева, што указује на доминантан Th1 одговор; ови мишеви су такође имали нижу еозинофилну инфилтрацију и хиперреактивност дисајних путева (302). Разлике између ове две студије могу бити резултат различитих ефеката ендогеног протеина у поређењу са прекомерном експресијом Gal-3 или компензационим механизмима код Gal-3 *knockout* мишева од стране других чланова породице галектина. Такође се показало да Gal-3 модулира понашање Т-ћелија; инхибиција Gal-3 коришћењем антисенс технологије блокира пролиферацију TCR-стимулисаних Т ћелија (323).

Највећи докази су настали код мишева са недостатком манозил (алфа-1,6)-гликопротеин бета-1,6-N-ацетил-глукозаминилтрансферазе (енгл. *mannosyl (alpha-1,6)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase*, Mgat5); ови мишеви показују повећану TCR активацију, подложност аутоимунским болестима и појачан Th1 одговор, што се све може приписати неефикасном формирању мултивалентних решетки Gal-3 и N-гликана у TCR комплексу (324).

Једна област биологије Gal-3 могла би се потенцијално позитивно искористити током резолуције запаљења. Алтернативно активирање макрофага покреће побољшање и дешава се када су макрофаги стимулирани Th2 цитокинима IL-4 или IL-13. Таква активација је имплицирана у бројним патолошким стањима, укључујући одговор домаћина на паразитарне инфекције, астму, репарацију рана и фиброзу код грануломатозне болести. Чини се да је Gal-3 неопходан за алтернативну активацију макрофага јер смањење Gal-3 блокира алтернативну активацију посредовану IL-4, мерену активацијом аргиназе и експресијом алтернативних маркера; док на класичну активацију изазвану IFN- $\gamma$ /LPS није било утицаја (325). Штавише, алтернативна

активација са IL-4 и IL-13 стимулише експресију и ослобађање Gal-3, док класична активација са IFN- $\gamma$ /LPS инхибира експресију Gal-3.

#### 1.24. Gal-3 и имунски одговор *in vivo*

Gal-3 *knockout* као и Gal-1/Gal-3 двоструки *knockout*-и мишеви, су одрживи, плодни и развијају се нормално (326). Међутим, откривено је да Gal-3 *knockout* мишеви спонтано развију патолошке промене у јетри у доби од 6 месеци типичне за неалкохолну масну болест јетре. Ове промене могу бити последица функције Gal-3 као рецептора AGEs, са нивоима AGE и AGE рецептора RAGE повећаним код Gal-3 *knockout* мишева (327). Међутим, бројне студије су спроведене коришћењем ових мишева и поређења између мишева дивљег типа и Gal-3 *knockout* мишева су подржала концепт да овај лектин игра претежно проинфламаторну улогу *in vivo*.

Неколико студија је показало да Gal-3 *knockout* мишеви показују смањену инфламаторну реакцију у поређењу са мишевима дивљег типа, чиме се наглашава проинфламаторна природа овог протеина. Мањи број неутрофила се регрутује у перитонеум након ињекције тиогликолата (328) и у плућа након инфекције *S. pneumoniae* (329). Повећано преживљавање Gal-3 *knockout* мишева је примећено након интрацеребралне и периферне инфекције код болести лудих крава (303), док Gal-3 *knockout* мишеви имају смањено формирање гранулома након инфекције шистосомијазом (330), болешћу која се иначе карактерише Th2 одговором. Gal-3 *knockout* мишеви су међутим, реаговали Th1 одговором као што је показано повећаним нивоима IFN- $\gamma$  и IgG2b. Чини се да Gal-3 мења снагу имунског одговора изазваног DCs. Зреле DCs *knockout* мишева су изазвале повећану пролиферацију, као и појачану продукцију IFN- $\gamma$  и IL-4 од стране T ћелија. Инфекција Gal-3 *knockout* мишева са другим паразитом, *T. Gondii*, поново је резултирала смањеном инфламацијом и јачим Th1 одговором који је евидентан повећањем нивоа IFN- $\gamma$  и IL-12 (331). Смањено преживљавања *knockout* мишева који су *i.p.* примили паразит било је повезано са недостатком прилива PMN и макрофага у перитонеалну шупљину.

Иако се чини да Gal-3 има штетну улогу у низу инфламаторних и имунолошких стања, чини се да је супротан случај у условима као што је дијабетес, где AGE играју улогу у патогенези болести (332). AGE се формирају као резултат хипергликемије и познато је да су патогени медијатори већине компликација које су последица дијабетеса (333). Gal-3 је идентификован као AGE рецептор (AGE- R3) (334) који везује AGE високим афинитетом што резултира њиховом интернализацијом и деградацијом. Стога се верује да Gal-3-AGER пут делује као заштитни механизам према повредама изазваним AGE-ом (335). У прилог томе, Gal-3 *knockout* мишеви развијају убрзану гломерулопатију у моделу дијабетеса изазваног стрептозотоцином, са израженим повећањем циркулишућих и бубрежних/гломеруларних нивоа AGE (335). Gal-3 такође може утицати на експресију других протеина који се везују за AGE, што је подржано запажањем да недијабетични Gal-3 *knockout* мишеви имају смањене бубрежних/гломеруларних нивоа AGE-R1 (DDOST) и MSR1 (укљученог у уклањање AGE) и повећан AGE-R2 (PRKCSH) и RAGE (AGER) (посредна активација ћелија). Као резултат тога, способност ћелије да уклони AGE може бити угрожена. Не јављају се сви

ефекти Gal-3 код дијабетеса као резултат његове функције AGER. *Canning* и сарадници (336) су показали значајно мању дисфункцију унутрашње крвно-ретиалне баријере узроковану дијабетесом код Gal-3 *knockout* мишева него код дивљих мишева након 2 недеље, временске тачке у којој су нивои AGE упоредиви са контролама, стога је предложено да Gal-3 може да промени функцију васкуларних ћелија независно од везивања за AGE због бројних проинфламаторних дејстава. Супресија ангиогенезе током дијабетеса је познати феномен. Ишемија и неоваскуларизација мрежњаче проучавани су на мишем моделу пролиферативне ретинопатије изазване кисеоником код мишева дивљег типа и Gal-3 *knockout* мишева након перфузије претходно формираних AGE. Аблација Gal-3 је прекинула ишемију посредовану AGE-ом и повратила неоваскуларни одговор налик на онај који је примећен у контролама (337). Независно од везивања за AGE, показало се да Gal-3 повећава ангиогенезу (338); стога, може бити антиангиоген само у дијабетичком окружењу.

За разлику од његове проинфламаторне природе, Gal-3 *knockout* мишеви су подложнији ендотоксичном шоку од мишева дивљег типа са повећаном производњом проинфламаторних цитокина и NO (339). Утврђено је да Gal-3 везује LPS бројних бактерија укључујући *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* и *E.Coli* (340). Сматра се да се ове интеракције дешавају и преко CRD и N-терминалног домена Gal-3. Макрофаги без Gal-3 су имали повишену LPS-индуковану сигнализацију и стварање цитокина у поређењу са ћелијама дивљег типа које је инхибирао рекомбинантни Gal-3, док је блокирање Gal-3 неутрализујућим антителима у ћелијама дивљег типа повећало производњу цитокина као одговор на LPS. Насупрот томе, утврђено је да Gal-3 фаворизује преживљавање салмонеле (339). Gal-3 *knockout* мишеви су развили појачан Th1 одговор као одговор на инфекцију салмонелом, што је могло допринети његовој смањеној репликацији код Gal-3 *knockout* мишева. Осим што везује LPS, Gal-3 такође ступа у интеракцију са гљивицом *Candida albicans* преко  $\beta$ -1,2 манозида. Утврђено је да се Gal-3 локализује на нивоу фагоцитних чашица формираних око квасца и на периферији фагоцитованих квасаца (341). Подаци сугеришу да макрофаги различито реагују на *C. albicans* и *S. cerevisiae* кроз механизам који укључује TLR2 и Gal-3, за које се показало да су повезани у диференцираним макрофагима након инкубације са *C. albicans*.

### 1.25. Gal-3 у кардиоваскуларним болестима

Утврђено је да су процеси фиброзе и инфламације патофизиолошки механизми развоја срчане инсуфицијенције. Наиме, активирани макрофаги луче Gal-3 као плазматски биомаркер фиброзе и инфламације. Поједина истраживања показују да је ниво Gal-3 у позитивној корелацији са смртношћу код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом. Примена галектина, појачаће процес фиброзе, а самим тим и срчано оштећење. Уколико се на било који начин инхибира Gal-3, побољшаће се срчана функција (342, 343). Неки истраживачи су дошли до закључка да је Gal-3 значајан прогностички биомаркер и да ниво Gal-3 позитивно корелира са оштећеним артериовенским спојевима, повишеним притиском у плућној артерији и тешком дијастолном дисфункцијом. Поједини аутори су указивали на повишен ниво Gal-3 код оштећења леве коморе, што може указивати на потенцијалну улогу Gal-3 у ремоделовању леве коморе. Gal-3 је у комбинацији са можданим натриуретским пептидом (енгл. *Brain natriuretic peptide*, BNP) добар прогностички фактор за ризик од срчане

инсуфицијенције (342, 343). Миокардијални инфаркт са ST елевацијом (енгл. *ST Elevation Myocardial Infarction*, STEMI) показује позитивне корелације повишеног нивоа Gal-3 и матриксне металопротеиназе 3, моноцитног хемотаксичног протеина 1 и IL-8, али у неким истраживањима је показано да током инфаркта миокарда није било корелације између инфламаторних фактора и Gal-3 (9). Неки аутори су показали да је ниво Gal-3 повишен код атријалне фибрилације, док су други аутори такође показали повишене нивое Gal-3 код артеријске хипертензије која је повезана са хипертрофијом леве коморе. Код кардиомиопатије, повишен ниво Gal-3 корелира са фиброзом миокарда и смањеном дијастолном и систолном функцијом (299, 343). Постоје подаци у литератури о корелацији између повишеног нивоа Gal-3, срчане и бубрежне инсуфицијенције (343). Сматра се да Gal-3 и у бубрежном и у срчаном ткиву индукује процес фиброзе. Није примећено да ниво плазматског Gal-3 корелира са тежином клиничке слике код срчаних слабости, али је примећено да се његов ниво смањује након поправљања бубрежне функције (299, 343).

### 1.26. Gal-3 и малигна обољења

Gal-3 је врло значајан прогностички фактор код многих карцинома. Ови подаци су изузетно значајни за побољшање дијагностичких алата, поготово у садејству са другим факторима. Такође, утицај и улоге Gal-3 у карциногенези су важни у контексту планирања терапеутских опција. За сада, пронађен је значајан утицај Gal-3 на фоликуларни карцином штитасте жлезде и туморе хипофизе, карцином простате, карцином панкреаса, хепатоцелуларним карцином, карцином дојке и бешике, остеосарком као и на друге карциноме дигестивног и уринарног тракта (343, 344)

Повишен ниво Gal-3 је пронађен код особа које болују од фоликуларног карцинома штитасте жлезде. Ово је значајно у диференцијацији различитих тироидних обољења. Важно је имати на уму да чак и аспирациона биопсија (енгл. *Fine Needle Aspiration Biopsy*, FNAB) није апсолутно поуздана дијагностичка метода, док се ниво Gal-3 у комбинацији са мезотелијалним епитопом 1 (енгл. *Hector Battifora mesothelial epytope-1*, HBME-1), цитокератином 19 и CD44, сматра најпоузданијим параметрима за постављање дијагнозе фоликуларног карцинома штитасте жлезде (345). Серумски ниво Gal-3 је повишен и код карцинома простате, а заједно са повишеним вредностима туморских маркера (СА-19 и СЕА) представља поуздан биомаркер за постављање дијагнозе карцинома панкреаса (346). Ниво Gal-3 је такође повишен код агресивнијих облика хепатоцелуларног карцинома, док су резултати појединих истраживања на експерименталним животињама показали да се блокирањем гена за Gal-3 развија мање инвазиван облик овог карцинома (343). Серумски и ткивни ниво Gal-3 повећан код пацијената са карциномом бешике и то више код карцинома прелазних ћелија у односу на карцином сквамозних. Ниво Gal-3 је позитивно корелирао са стадијумом карцинома прелазних ћелија, и ниво Gal-3 такође је био виши код мишићно инвазивних у односу на папиларне неинвазивне туморе (347). Када је у питању ниво Gal-3 код карцинома желуца, уочава се врло интересантна разлика код серумског и ткивног нивоа галектина. Серумски ниво Gal-3 позитивно корелира са присуством метастаза у лимфним чворовима и удаљеним метастазама код карцинома желуца. Није пронађена повезаност између серумског нивоа галектина са стадијумом болести и ефектима хемиотерапије. С друге стране, ткивни Gal-3 смањен је 1,5 пута код тумора желуца. Смањење ткивног

Gal-3 корелира и са удаљеним метастазама и инвазивнијим типом фенотипа (348). Серумски нивои Gal-3 виши су код пацијената са хроничном промијелоцитном леукемијом (349). Виши ниво Gal-3 корелира са нижом стопом преживљавања и краћим ремисијама. Код *Non-Hodgkin* лимфома виши ниво Gal-3 се јавља удружено са кардиоваскуларним компликацијама (350). Код карцинома ендометријума, виши ниво Gal-3 указивао је на виши хистолошки степен и већу инвазивност тумора, док је код хипофизе тумора који луче пролактин и АСТН тачност дијагностиковања уз помоћ нивоа серумског Gal-3 била приближно 90% (350). Ниво Gal-3 је виши код пацијената са карциномом жучне кесе, у односу на особе које имају холециститис или полипе као и код оних са остеосаркомом (352). Gal-3 је повећан 11,3 пута код пацијената оболелих од колоректалног карцинома, а код оних са метастазама чак и 31 пут (343). Експресија Gal-3 је повећана код пацијената са карциномом реналних ћелија код којих је нађена и повишена mRNA за Gal-1 и Gal-3 (343, 344).

### **1.27. Gal-3 у болестима бубрега**

Gal-3 је лектин откривен раних 80-их у туморским ћелијама. Од тада је проучавана улога овог протеина код неколико органа и повезаних повреда (353-355). Било да је у питању рак, кардиоваскуларне или бубрежне болести, његова патофизиологија остаје сложена. Међутим, фармаколошка инхибиција Gal-3 може имати потенцијалне терапеутске импликације. Учешће Gal-3 у бубрежним болестима је недавно истражено и у претклиничким и у клиничким испитивањима, а његова повећана експресија може бити повезана са специфичним оштећењем бубрега и прогнозом.

### **1.28. Gal-3 у бубрезима**

Током развоја, Gal-3 се углавном експримира у сабирним каналима, унутар или на апикалној мембрани  $\alpha$ -интеркаларних ћелија. Ово сугерише улогу Gal-3 у развоју тубула (356), вероватно преко међућелијске адхезије или интеракције са ЕСМ у циљу промовисања тубулогенезе (357). У одраслом бубрегу, експресија Gal-3 се детектује у главним и интеркаларним ћелијама, у проксималним тубулима и асцедентним тубулима (358).

Фармакокинетика Gal-3 није у потпуности објашњена, али многи истраживачки радови сугеришу бубрежну елиминацију Gal-3 јер може слободно да прође кроз гломеруларну мембрану (279). Gal-3 је протеин ниске молекуларне тежине, између 29 и 31 KDa, и нема доказа који би указивали на повезаност са албумином у екстраћелијским регионима (359). *Meijers* и сарадници (15) су у експерименту са пацовима проценили да се Gal-3 слободно и потпуно излучује урином са клиренсом од 0,92 mL/min и запремином дистрибуције од 90 mL. Код здравих људи, израчуната брзина излучивања Gal-3 била је 3,9 0,92 mL/min (2,3 до 6,4), а фракционо излучивање Gal-3 је било 3,0% (1,9 до 5,5). Коначно, за пацијенте на хемодијализи, Gal-3 се може филтрирати дијализатором, али са нижом стопом од креатинина. У патолошким стањима, експресија Gal-3 варира и проучавана је у претклиничким и клиничким студијама.

### **1.29. Gal-3 у претклиничким моделима болести бубрега**

Улога Gal-3 у бубрежној исхемији/реперфузији (енгл. *renal ischemia/reperfusion*, rIR) је пријављена у различитим студијама. *Nishiyama* и сарадници (11) су показали да rIR код пацова изазива брзу прекомерну експресију Gal-3 mRNA и да негативно корелира са дозом креатинина у серуму након 48 h ( $R = -0,94$ ). Прекомерна експресија Gal-3 је проширена на дисталне тубуле 48 h након повреде. Штавише, генетска инхибиција Gal-3 у овом моделу била је повезана са мањом инфилтрацијом и активацијом макрофага, мањим оштећењем ткива (производња ROS-а, тубуларна некроза) и побољшаном функцијом бубрега (360).

Недавно је показано повећање плазматске, mRNA и протеинске експресије Gal-3 24h након rIR-а због тубуларне деструкције и инфилтрације инфламаторних ћелија. Повећани нивои проинфламаторних цитокина у плазми, као што су IL1b, IL-6, TNF- $\alpha$ , и IL-10, били су повезани са секрецијом Gal-3 од стране имунских ћелија и у корелацији са прекомерном експресијом Gal-3 растворљивог у плазми. Занимљиво је да су повећани нивои проинфламаторних цитокина смањени код Gal-3 *knockout* мишева (361). Штавише, популација реналних интерстицијалних ћелија Gal-3 (+), CD44 (+) и виментин (+) (маркери процеса регенерације) идентификована је у спољашњој медули око некротичних тубула и у суседним капиларама након rIR-а, што сугерише да Gal-3 посредује у активацији ендотела и регенерацији бубрежних тубула у овим експерименталним условима (362). Све ове студије су откриле специфичну улогу Gal-3 након rIR-а, који промовише активацију ендотела, секрецију цитокина и запаљење бубрега, што доводи до ремоделовања ткива и даље фиброзе. У овом моделу, инхибиција Gal-3 је заштитила од последица повезаних са бубрежном болешћу (запаљење, фиброза, секреција цитокина) (363).

### 1.30. Токсично оштећење

У токсичним претклиничким моделима експерименталне нефропатије, тубуларна оштећења су мање изражена него у моделима rIR-а. У токсичном моделу нефропатије изазване фолном киселином, *Nishiyama* и сарадници (11) су приметили брзо повећање реналне експресије Gal-3 mRNA. Штавише, примећена је екстензивна експресија Gal-3 из проксималних канала до различитих врста тубула, укључујући проширене сабирне канале. Четрнаест дана након повреде, Gal-3 је такође откривен у макрофагима и прогресија фиброзе је спречена након инхибиције Gal-3 са мањом апоптозом и инфламацијом бубрега (364).

У моделу АКI изазваног цисплатином, *Li* и сарадници (365) су приметили повећање експресије Gal-3 бубрега 3. дана, повезано са прекомерном експресијом протеин киназа Ц (енгл. *Protein kinase C alpha*, PKC- $\alpha$ ), ћелијском апоптозом и синтезом колагена типа I. Занимљиво је да је инхибиција Gal-3 ограничила транзицију АКI у HRI. Насупрот томе, *Воларевић* и сарадници (366) су показали да је, у сличном моделу АКI, експресија Gal-3 у имунским ћелијама повезана са регулацијом имуносупресије преко бубрежних дендритских ћелија, активацијом TLR-2 и секрецијом IL-10. Ови налази сугеришу могућу штетну улогу инхибиције Gal-3 у регулацији имунског одговора.

Дакле, Gal-3 може имати контрадикторне улоге, у зависности од ћелије која га експримира након повреде бубрега (тј., профибротичан када га синтетишу тубуларне ћелије, и антифибротичан када га производе макрофаги).



### 1.31. Гломеруларно оштећење

У неким студијама је пријављена измењена експресија Gal-3 у повређеним гломерулима. У моделу дијабетичке нефропатије изазване стрептозотоцином код пацова, Gal-3 је био прекомерно експримиран од 2 до 12 недеља код дијабетичких пацова, и то углавном у мезангијалним ћелијама (367). Прекомерна експресија Gal-3 модулирала је гломеруларно ремоделовање RAGE (367). Користећи исти експериментални модел, ови аутори су показали да недостатак Gal-3 доводи до убрзане дијабетичке гломерулопатије праћене гломеруларном акумулацијом AGE услед смањења RAGE (335). Поред тога, ињекција Н-карбоксилметиллизина, код мишева је изазвала акумулацију AGE повезану са повредом гломерула. Штавише, инхибиција Gal-3 доводи до убрзане гломеруларне болести преко виших нивоа AGE у циркулацији и измењених функција RAGE (332). Zhang и сарадници (368) су предложили AGE посредовани механизам оштећења преко дугачке некодирајуће секвенце рибонуклеаза П RNA компонента H1 (енгл. *Ribonuclease P RNA Component H1*, Rpph) која је у интеракцији са Gal-3, промовишући *MERF/ERK* пут трансдукције што доводи до прекомерне експресије MCP-1 и пролиферације мезангијалних ћелија (368).

У другом претклиничком моделу који је користио трансгене Ren-2 пацове који су развили тешку гломерулосклерозу повезану са хипертензијом, прогресија гломерулопатије и протеинурије је била повезана са повећаним нивоима Gal-3 у плазми. У овом моделу, инхибиција Gal-3 је повећала оштећење и функцију бубрега (369).

Коначно, ињекције *anti-Thy1.1* антитела код пацова су показале да је прогресија гломерулонефритиса повезана са повећаном експресијом Gal-3 у дисталним тубулима и инфилтрираним гломеруларним макрофагима и може играти улогу у мезангијалној хиперцелуларности (370).

Ови подаци показују сложену улогу Gal-3 у оштећењу гломерула. Чини се да инхибиција Gal-3 смањује његову редукцију што резултује убрзањем гломерулопатије, док Gal-3 може играти заштитну улогу када се његова експресија повећава у тубулима и у мезангијалним ћелијама током гломерулопатије, што резултује смањењем инфилтрације специфичних имунских ћелија повезаних са Gal-3.

### 1.32. Gal-3 у имунски посредованим оштећењима бубрега

*Болест бубрега повезана са сепсом*

У моделу перитонитиса код пацова, Gal-3 је био повећан код оштећења бубрега повезаних са сепсом. Штавише, фармаколошка инхибиција Gal-3 посредством модификованог цитрусног пектина (енгл. *modified citrus pectin*, MCP) смањила је инфламацију бубрега, IL-6 у плазми и побољшала бубрежну функцију и преживљавање (371).

*Трансплантацијски модел*

Показано је да Gal-3 модулира инфламацију и инфилтрацију имунских ћелија у патофизиолошким стањима. Трансплантацијски модели су повезани са дисфункцијом

трансплантата која је посредована имунским ћелијама. *Dang* и сарадници (294) су пресадили VM12 бубрег из WT мишева, у WT мишеве или у Gal-3 *knock-out* мишеве. У трансплантату WT мишева, дошло је до Gal-3 ткивне и плазматске регулације. Gal-3 *knock-out* мишеви су имали мање тубуларне повреде, умерену фиброзу и мању инфилтрацију имунским ћелијама (294). Ове студије су потврдиле улогу Gal-3 у регрутовању имунских ћелија током патолошког процеса, а инхибиција Gal-3 је побољшала бубрежни исход.

#### *Полицистични модел*

У моделу конгениталног полицистичног бубрега (енгл. *congenital polycystic kidney*, СРК) код мишева, примећена је експресија Gal-3 у цилијама дилатираних сабирних канала. Занимљиво је да је ињекција Gal-3 смањила број циста код мишева, док су Gal-3 *knock-out* мишеви показали већи однос тежине бубрега/модификовану структуру цилија. Ова студија наглашава главну улогу тубуларне експресије Gal-3 у развоју тубула и његових структурних последица (372).

#### *Фиброза бубрега*

Пријављено је да Gal-3 промовише фиброзу у неколико органа (353) и игра главну улогу у транзицији из акутне у хроничну болест бубрега, промовишући ослобађање инфламаторних фактора, активацију инфламаторних ћелија и повреду ткива (373). Међутим, улога Gal-3 у овој намени је још увек предмет расправе.

Gal-3 је повезан са пролиферацијом ћелија које производе ЕСМ (фибробласта и миофибробласта), што може бити повезано са миграцијом и адхезијом таквих ћелија (374). Такође је пријављено да је степен оштећења бубрега и фиброзе био екстензивнији код Gal-3 *knock-out* мишева са повећаним укупним колагеном, док је одговарајуће смањење синтезе миофибробласта и ЕСМ-а путем смањења ендo180 рецептора укључених у деградацију колагена било веће (375).

Користећи модел једностране опструкције уретера (енгл. *unilateral ureteral obstruction*, UUO), *Gasparitsch* и сарадници (376) су показали да је експресија Gal-3 повезана са повећаном експресијом колагена I. Аутори су приметили да је експресија Gal-3 мање важна код RAGE<sup>-/-</sup> или RAGE<sup>-/-</sup> ICAM<sup>-/-</sup> мишева. Ови подаци сугеришу да је асоцијација Gal-3 и RAGE/ICAM укључена у прелазак од акутног оштећења до фиброзе (376). У истом експерименталном моделу, *Henderson* сарадници (363) су се фокусирали на инфилтрацију макрофага и приметили су да макрофаги који експримирају или луче Gal-3, промовишу активацију бубрежних фибробласта до профибротичног фенотипа (363). Штавише, специфично исцрпљивање макрофага коришћењем CD11b-DTR мишева смањило је фиброзу у овом моделу (363).

Коначно, исхраном са високим садржајем масти код пацова, модел који карактерише изражено оштећење гломерула и тубула, фармаколошком инхибицијом Gal-3 побољшан је имунски одговор и смањена је бубрежна фиброза. Поред тога, у другом моделу фиброзе изазване оклузијом аорте, фармаколошка инхибиција Gal-3 је такође смањила фиброзу (377).

Ове студије показују профибротичку улогу експресије Gal-3 у патофизиолошком одговору на повреду. Изгледа да је експресија Gal-3 у имунским ћелијама повезана са

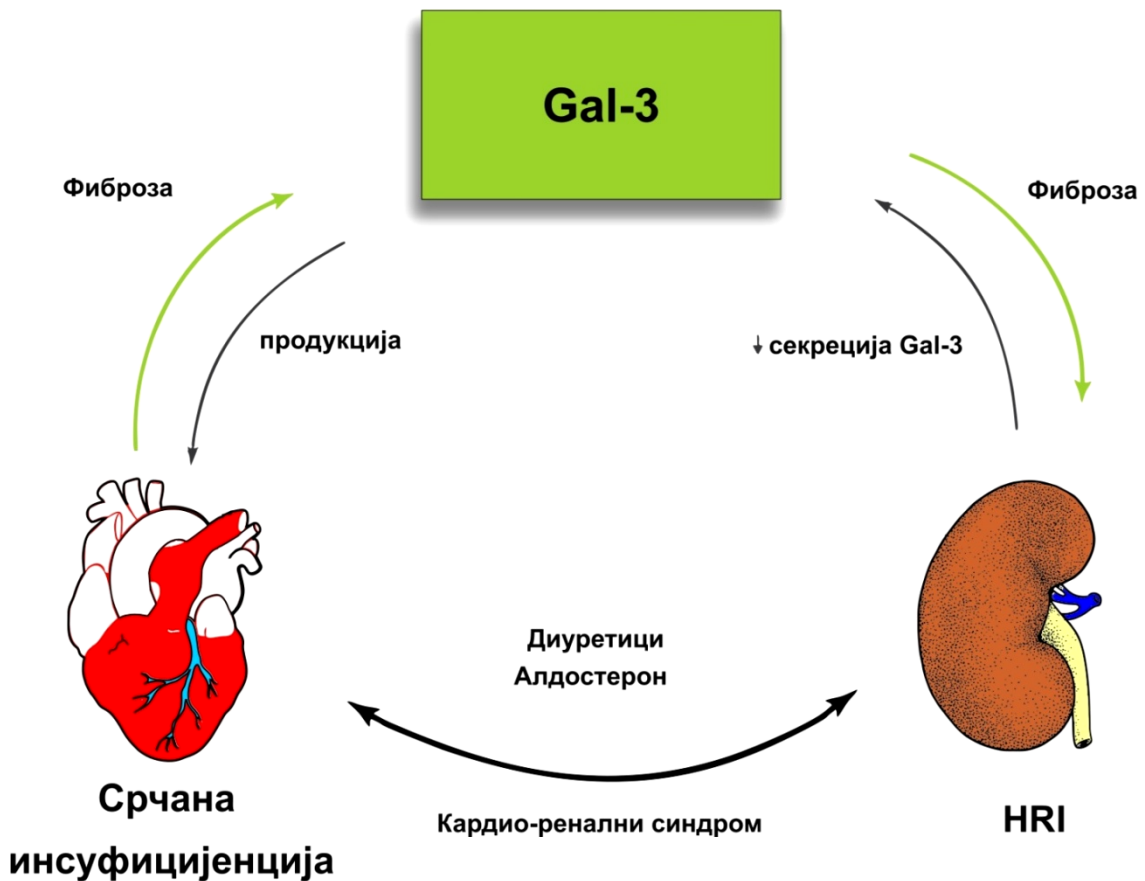
фиброзом бубрега. Међутим, експресија Gal-3 у ткиву доводи до боље регенерације ткива и мање фиброзе након повреде бубрега регулацијом колагена преко специфичних рецептора.

### 1.33. Модел кардио-рениалног синдрома

Недавно је идентификована потенцијална улога Gal-3 у кардио-рениалном синдрому типа 3 (378). У овој студији, мишеви су оперисани процедуром леве рениалне реперфузија-исхемија након десне нефректомије да би се изазвала пролазна бубрежна дисфункција, која се брзо нормализовала након 48h, не изазивајући хиперволемију или уремијски синдром. Ово доводи до смањења скраћења срчане фракције и повећања срчане фиброзе након 28 дана. Слични резултати су примећени након једностране оклузије уретера. Ова студија је истакла улогу акутног оштећења бубрега које доводи до почетка срчане дисфункције (361). У овом експерименталном моделу, Gal-3 је повећан у плазми, бубрежном ткиву, а касније и у срчаном ткиву након реперфузије-исхемије бубрега. Инхибиција Gal-3 спречила је срчану дисфункцију. Штавише, у моделу мишева са трансплантацијом коштане сржи утврђено је да имунске ћелије које експримирају Gal-3 у срцу промовишу фиброзу, а њихова инхибиција у побољшава срчани фенотип. Ова студија сугерише потенцијалну улогу Gal-3 у интеракцији између бубрега и срца током кардио-рениалног синдрома типа 3 (361). Улога Gal-3 у започињању кардиорениалног синдрома остаје непозната, док неке претклиничке студије покушавају да идентификују бубрежну улогу Gal-3 у овом контексту (378).

Како би пружили даље увиде у корелације излучивања Gal-3 у урину у код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, *Meijers* и сарадници (15) су проучили и идентификовали занимљиво запажање између Gal-3, алдостерона у плазми и употребе диуретика (**Слика 3**). У експерименталним студијама сугерисана је блиска веза између алдостерона и Gal-3 (280). Хронична употреба диуретика је праћена реципрочном активацијом RAAS система, а то доводи до повишених нивоа алдостерона у циркулацији (286). Међутим, хронична употреба диуретика је повезан са прогресивном гломерулосклерозом и не мора увек бити од користи за пацијента (287). Јасно је да се не може искључити да повезаност између употребе диуретика, повишеног алдостерона и повишених нивоа Gal-3 може бити помешана са озбиљношћу болести. Међутим, раније је показано да је хронична употреба диуретика повезана са повећањем нивоа алдостерона. На основу података *Meijers* и сараданика (15), повишен ниво Gal-3 је повезан са развојем и прогресијом срчане инсуфицијенције, али и са развојем бубрежне болести. У њиховом истраживању, Gal-3 у плазми је био јасно повишен, док су нивои у урину слични онима код контролних субјеката. Ово се може објаснити смањеним бубрежним клиренсом Gal-3 и мањим клиренсом фракционог Gal-3, а то је повезано са високим нивоом алдостерона и употребом диуретика. Ово је подржано изузетно повишеном концентрацијом Gal-3 код пацијената на хемодијализи. Тако да смањени бубрежни клиренс Gal-3 код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом може делимично да објасни акумулацију и повећање Gal-3 у плазми код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом. Ови подаци помажу да се објасни уочена веза између бубрежне дисфункције и Gal-3 код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом, али такође могу

пружити нови механизам којим се објашњава зашто дисфункција бубрега има штетне дугорочне последице на пацијенте са срчаном инсуфицијенцијом.



Слика 3. Улога Gal-3 у кардио-реналном синдрому. Хипотетичка шема која приказује могуће интеракције између Gal-3 и алдостерона у кардиореналној болести. Повишен ниво Gal-3 је повезан са развојем и прогресијом срчане инсуфицијенције, али и са развојем HRI. Хронична употреба диуретика је праћена реципрочном активацијом RAAS система што резултира повишеним нивоима алдостерона у циркулацији, као и са прогресивном гломерулосклерозом (кориговано према: Meijers WC. J Am Heart Assoc. 2014;3:e000962). Gal-3-галектин 3, HRI-хронична ренална инсуфицијенција

### 1.34. Gal-3 као биомаркер

Функција бубрега

У почетку је Gal-3 проучаван као биомаркер срчане повреде (379), али од тада је неколико студија проценило његову улогу као биомаркера акутне повреде бубрега.

*Drechsler* и сарадници (380) су измерили основни ниво Gal-3 у Немачкој студији (1168 пацијената на дијализи са дијабетес мелитусом типа 2) и студији *Ludwigshafen* ризика и кардиоваскуларног здравља (*Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health*, LURIC) (2579 пацијената са коронарним ангиограмима). Ниво Gal-3 се постепено повећавао са тежином бубрежне болести: са  $2.8 \pm 4.0$  ng/mL (eJGF  $\geq 90$  mL/min на  $1.73$  m<sup>2</sup>) до  $54.1 \pm 19.6$  ng/mL (пацијенти на дијализи 4Д студије) (380).

*Von Ballmos* и сарадници (381) су испитивали плазматски ниво Gal-3 након кардиохируршке интервенције код 1498 пацијената, и највиши терцил Gal-3 је био повезан са тешким акутним оштећењем бубрега (OR 2.95;  $p < 0.001$ ) (381).

У дуготрајној студији која ја пратила 1320 пацијената са дијабетесом типа 2 и eJGF  $\geq 30$  mL.min<sup>-1</sup> 1.73 m<sup>-2</sup>, *Tan* и сарадници (382) су показали је да је Gal-3 независно повезан са удвостручавањем серумског креатинина (HR 1.19 CI<sub>95%</sub>[1.14, 1.24],  $p < 0.001$ ) чак и након прилагођавања хроничних фактора ризика за бубреге, почетне eJGF и статуса албуминурије (382).

У другој транслацијској студији која је укључивала пацијенте примљене у јединицу интензивне неге (енгл. *intensive care unit*, ICU) са тешком сепсом, откривено је да су средњи нивои Gal-3 у серуму и урину на пријему били виши код пацијената са АКІ у поређењу са пацијентима без АКІ (18.37 у поређењу са 8.08 ng/mL,  $p < 0.001$ ; нивои Gal-3 у урину за пацијенте са АКІ у поређењу са пацијентима без АКІ: 13,27 у поређењу са 66.27 ng/mL,  $p < 0.001$ ), са добром перформансом предвиђања за АКІ (AUC од 0,88 за Gal-3 у серуму и 0,87 за Gal-3 у урину) (371). У популацији са срчаном инсуфицијенцијом, *Ahmed* и сарадници (382) су истраживали кохорту од 132 пацијента, а уринарни Gal-3 је био повезан са повећаним ризиком од смрти након прилагођавања биомаркера оштећења бубрега (енгл. *renal injury biomarker*, urinary NGAL) (382).

Недавно је показано да је ниво Gal-3 у плазми на пријему у ICU, са хетерогеном дијагнозом, повезан са АКІ са OR од 1.12 CI<sub>95%</sub> [1.04, 1.2] након прилагођавања биомаркера тежине и придруженог фактора опоравка (тј. пол, старост, HRI, терапија вазопресорсима, SAPSII, Charlson score и ниво лактата на пријему). Повећање Gal-3 у плазми је било у корелацији са озбиљношћу АКІ, 16,6 (12,7–34,2) ng/mL за пацијенте без АКІ и од 23,6 (18,2–34,2) ng/mL за скор бубрежне болести која побољшава глобалне резултате (енгл. *Kidney Disease Improving Global Outcomes*, KDIGO) KDIGO 1 до 38 (24.5–57.1) ng/mL за KDIGO 3 (383).

Ове студије сугеришу потенцијалну могућност коришћења плазматског и уринарног Gal-3 као биомаркера тежине АКІ у хетерогеној популацији без обзира на порекло бубрежне дисфункције.

### Протеинурија

*Kikuchi* и сарадници (384) су показали корелацију између гломеруларно инфилтрираних Gal-3 позитивних моноцита и протеинурије у биопсијама бубрега 37 пацијената са гломерулонефритисом (GN) ( $r = 0.616$ ,  $p < 0.001$ ) (384). Штавише, код лупусног GN, *Kang* и сарадници (385) су открили изражену гломеруларну експресију Gal-3 код 81,8%

(72/88) пацијената повезаних са бубрежним инфламаторним ћелијама (385). Ова прекомерна експресија Gal-3 била је у корелацији са индексима хистолошке активности, анти-dsDNA титрима и нивоима комплемента 3 и 4 (385). Код деце, *Ostalska-Nowicka* и сарадници [386] су истраживали различите типове GN (болест минималних промена (енгл. *minimal change disease*, MCD), мезангијалну пролиферацију (енгл. *mesangial proliferation*, DMP) и фокалну сегментну гломерулосклерозу (енгл. *focal segmental glomerulosclerosis*, FSGS) и идентификовали кортикалне и медуларне ћелије које експримирају Gal-3 и које не реагују на терапију стероидима ( $p < 0.001$ ) (386).

Седамдесет пет пацијената са медитеранском грозницом (енгл. *Mediterranean fever*, FMF) који имају GN је имало више серумске нивое Gal-3 у поређењу са контролном групом и што је још важније, код пацијената са протеинуријом са корелационим односом за протеинурију/креатинин од 0.785,  $p < 0.001$ . Учинак предвиђања серумског Gal-3 за протеинурију имао је вредност AUC од 0,88 (387).

У студији попречног пресека која је укључивала 90 пацијената, ниво Gal-3 у плазми је био значајно виши код макроалбуминурије ( $p \leq 0,05$ ) и код пацијената са ослабљеном бубрежном функцијом (Стад IV–V HRI), са учинком предвиђања од 0,776 (CI<sub>95%</sub>[0.677, 0.875];  $p \leq 0.0001$ ) (388).

На основу ових студија, повећана ренална и плазматска експресија Gal-3 повезана је са инфилтрацијом имунским ћелијама које експримирају Gal-3 код пацијената са гломеруларним оштећењем.

#### *HRI и бубрежна прогноза*

*Alam* и сарадници (389) су идентификовали високе нивое Gal-3 у плазми код пацијената са тешким коморбидитетима (срчана инсуфицијенција, HRI) у 2 лонгитудиналне кохортне студије, укључујући пацијенте са HRI : студија клиничке фенотипизације и биобанке ресурса (C-PROBE) и студија бубрега у Сијетлу, који су били повезани (HR = 1.35, CI<sub>95%</sub>[1.01–1.80]) са HRI (389). У проспективној студији атеросклеротског ризика у заједницама, *Rebholtz* и сарадници (390) су измерили нивое Gal-3 у плазми код 9148 пацијената без HRI и хроничне срчане инсуфицијенције. Аутори су показали да је Gal-3 био виши за ниску процењену JGF, низак однос албумина и креатинина у урину и био је повезан са HRI са OR од (2.22 CI<sub>95%</sub>[1.89, 2.60]) (390).

У другој кохорти, укључујући пацијенте са HRI, нивои Gal-3 у плазми били су повезани са повишеним серумским креатинином, односом протеина/креатинина у урину и били су независно повезани са прогресијом HRI (391).

Једна група је истраживала бубрежну прогнозу користећи критеријуме за велики нежељени бубрежни догађај (енгл. *Major Adverse Kidney Event criteria*, MAKE) у кохорти од 2076 пацијената који су примљени у ICU (383). Примећено је да је доза Gal-3 при пријему била повезана са MAKE са OR од 1.37 CI<sub>95%</sub>[1.27, 1.49]. Предиктивни учинак Gal-3 за MAKE имао је AUC ROC за предиктивне перформансе MAKE од 0.76 CI<sub>95%</sub> (0,74–0,78) (383).

Ои и сарадници (392) су показали, код 249 пацијената који су били подвргнути биопсији бубрега, да пацијенти са HRIу поређењу са онима без HRIмају виши ниво Gal-3 у плазми. Виши нивои Gal-3 су такође били повезани са интерстицијалном фиброзом, тубуларном атрофијом и васкуларном фиброзом интима, а RNA секвенцирање показало је повећање Gal-3 у узорцима биопсије фиброзног бубрега (392).

Ове студије показују повезаност и потенцијалну улогу Gal-3 са лошом прогнозом бубрега и еволуцијом акутне повреде до хроничног оштећења бубрега.

### *Трансплантација*

Постоји велика потреба за добрим биомаркером у трансплантацији бубрега јер може да омогући промене терапијске стратегије. *Sotomayor* и сарадници (393) су анализирали 561 пацијента и почетну вредност медијана Gal-3 од 21,1 (IQR [Q1:17.0, Q2:27.2] ng/mL. У овој студији, Gal-3 је био повезан са повећаним ризиком од отказивања трансплантата (односи ризика (енгл. *hazard ratios*, HR) по 1 SD промена, 2,12; CI<sub>95%</sub>[1.63, 2.75];  $p < 0.001$ ), што је још важније за пацијенте са хипертензијом (HR, 2.29; CI<sub>95%</sub>[1.80, 2.92];  $p < 0.001$ ) или историјом пушења (HR, 2.56; CI<sub>95%</sub>[1.95, 3.37];  $p < 0.001$ ) (393).

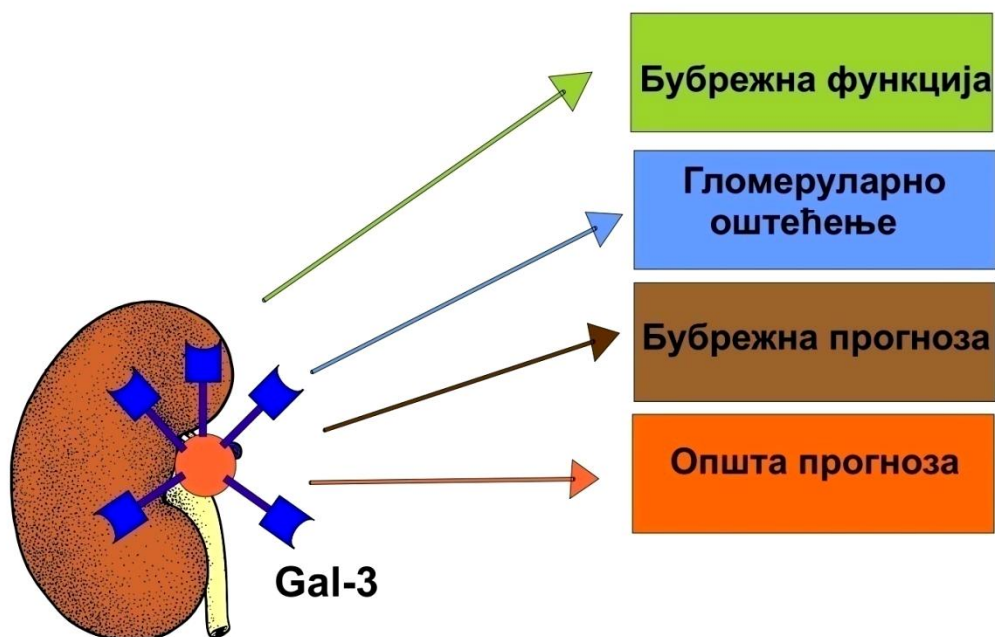
### *Морталитет и лош кардиоваскуларни исход*

Коначно, пацијенти са бубрежним обољењима често имају већу стопу mortalитета. У 4D и LURIC-у, високи нивои Gal-3 у плазми били су значајно повезани са смртношћу од свих узрока, или кардиоваскуларним mortalитетом, у популацији са оштећењем бубрега у поређењу са пацијентима без бубрежне болести (380). *Hogas* и сарадници (16) су потврдили код пацијената на хемодијализи да је ниво Gal-3 > 23,73 ng/mL независан предиктор mortalитета (HR: 2.60; CI<sub>95%</sub>[1.09, 6.18]) (16).

Касније студије, у великој мета-анализи која је укључила 5226 пацијената, *Zhang* и сарадници (394) су потврдили да ову повезаност између Gal-3 и повећаног ризика од смртности свих узрока и кардиоваскуларних догађаја код пацијената са HRI (HR:1.379, [1.090, 1.744]) и повезаног са ризиком од KB догађаја код пацијената са HRI (HR = 1.054, CI<sub>95%</sub>[1.007, 1.102]) (394).

Тако се показало да је код пацијената са AKI, Gal-3 добар биомаркер лоше кардиоваскуларне прогнозе (395). Ови резултати наглашавају улогу Gal-3 у кардио-реналном синдрому. Неке претклиничке студије су почеле да идентификују Gal-3 као кључног играча у кардио-реналном синдрому типа 3 (361). Механизам у овом контексту остаје сложен, али повезује и имунолошку и ткивну експресију Gal-3.

Коначно, у популацији примљеној у ICU, недавно је утврђено да је Gal-3 при пријему био виши код пацијената који су преминули, што је даље повезано са смртношћу од свих узрока након 30 дана (OR CI 1.25, CI<sub>95%</sub> [1,17, 1,34] ), и имао је учинак предвиђања од 0,69 (CI<sub>95%</sub> (0,67–0,72)) (383). Стога се чини да је Gal-3 повезан са кардиоваскуларним исходима и смртношћу након болести и повреде бубрега. Све удружености Gal-3 и исходи у клиничким студијама су детаљно приказани на **Слици 4**.



**Слика 4. Повезаност реналног Gal-3 са исходом у клиничким студијама.** Gal-3 је повезан са бубрежном функцијом и њеним параметрима (JGF, АКI, KDIGO и бубрежни биомаркери), гломеруларним оштећењем (протеинурија и албуминурија), бубрежном прогнозом (однос протеина и креатинина, МАКЕ и интерстицијална фиброза) и општом прогнозом (морталитет и лош кардиоваскуларни исход) (кориговано према Boutin L. Int J Mol Sci. 2022;23:3124.)

### 1.35. Перспектива и терапијски циљ Gal-3

Само неколико клиничких студија је проценило утицај инхибитора Gal-3 и њихове терапеутске импликације. Слепо, мултицентрично, рандомизовано клиничко испитивање у IIa фази које је укључило 121 пацијента са HRI у 3b или 4 стадијуму, започето је коришћењем инхибитора Gal-3 GCS100 (регистрованог у клиничком испитивању као *NCT01843790*). Ова студија је имала за циљ да процени промену JGF од почетне вредности у односу на плацебо након примене GCS100 током 8 недеља (396). Аутори су утврдили да је 121 пацијент са HR лечен фармаколошким инхибитором Gal-3 и да је код тих пацијената дошло до значајног побољшања (JGF, нивоа мокраћне киселине и креатинина) у поређењу са плацебом, између почетног



стања и на крају лечења. Аутори нису пријавили било какве озбиљне нежељене ефекте при коришћењу дозе од  $1,5 \text{ mg/m}^2$  GCS100 (397).

*Lau* и сарадници су у рандомизованој контролисаној студији испитивали употребу MCP код хипертензивних срчаних компликација и открили да инхибиција Gal-3 није утицала на експресију срчаних биомаркера фиброзе, али је била благо повезана са смањењем плазматског креатинина и повећањем JGF код пацијената лечених MCP. Ово сугерише потенцијалну корист примене инхибитора Gal-3 код пацијената са оштећењем бубрега, иако нема довољно података да би се донели коначни закључци (398).

Gal-3 је такође испитиван у лечењу фиброзе код плућне болести. *Hirani* и сарадници (399) су лечили 36 здравих појединаца и 24 пацијента са плућном фиброзом инхалираним инхибитором Gal-3 и пријавили добру толеранцију код здравих пацијената и смањење плазматских маркера повезаних са плућном фиброзом (399). Неке студије су користиле инхибиторе Gal-3 у лечењу канцера, користећи резистенцију на лекове и крајњу тачку преживљавања (400), али ипак, инхибитори Gal-3 у лечењу канцера остају недовољно испитани за терапијске препоруке. Дубље истраживање Gal-3 или сродних путева има више перспектива. Прво, употреба Gal-3 као биомаркера је велики напредак у клиничком лечењу пацијената са бубрежном болешћу и може помоћи у праћењу и вођењу специфичног лечења. Друго, иако његова специфична терапијска употреба још није утврђена, Gal-3 може помоћи у стратификацији пацијената са оштећењем бубрега. Потребно је више претклиничких студија да би се потврдила инхибиција Gal-3 као потенцијални терапеутски циљ за ограничавање бубрежног оштећења.

### 1.36. Полиморфизми гена за Gal-3

Појам полиморфизми се односи на постојање гена у различитим облицима. Различити алели за исти ген кодираће различите молекуле. Такође могу имати значајно различите утицаје у оквиру свог дејства. Показано је да полиморфизми гена утичу на клиничке исходе и да постоји повезаност одређеног алела са негативним исходима. На тај начин се могу издвојити и мапирати одређени алели, као прецизни дијагностички биомаркери, али и као прогностички фактори (343).

*de Boer* и сарадници, су дошли до закључка да постоје 2 генома са значајним локусима повезаним са нивоом Gal-3 у плазми и експресијом гена *LGALS3*. Један локус садржи ген *LGALS3* (rs2274273;  $P = 2.35 \times 10^{-188}$ ) а други локус садржи ген *ABO* (rs644234;  $P = 3.65 \times 10^{-47}$ ). Варијанта за *LGALS3* локус је била 25.6%, а за *ABO* 3.8%, док је укупна за оба локуса била 29.2% (7).

У раду *Zhang* и сарадника (10) описана су 4, за сада позната, облика гена за Gal-3, алелски облици G, A, AA и C. G облик rs1009977 и C облик rs4652 су били су нижи код пацијената са дилатационом кардиомиопатијом. Варијанте rs1009977 и rs4652 биле су повезане са мањом склоношћу ка дилатационој кардиомиопатији. AA генотип и rs2274273 и rs4644 може бити повезан са нижом ејекционом фракцијом леве коморе код пацијената са дилатационом кардиомиопатијом. G облик rs1009977 и облици A rs2274273 и rs4644 корелирали су са нижим серумским нивоом Gal-3 (10). *Balan* и сарадници (401) су показали да постоји мутација гена за Gal-3 на позицији 191 (rs4644), где је дошло до замене пролина са хистидином, што је резултирало повећањем

афинитета за матриксну металопроотеиназу и самим тим и резистенцијом на апоптозу посредовану лековима (401).

У недавном истраживању показано је одсуство значајне разлике у главним нежељеним догађајима при категоризацији пацијената према *LGALS3* SNPs гена за rs4644 и rs4652. Циркулишући Gal-3 је повезан са миокардијалном фиброзом ( $p < 0,001$ ). Ниво Gal-3 у плазми и миокардијална фиброза могу предвидети повећан ризик од главних нежељених догађаја ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,023$ , респективно) (402). Пацијенти са анемијом српастих ћелија (енгл. *sickle cell anemia*, SCA) могу имати епизоде хроничне хемолитичке анемије, вазооклузије и инфекције респираторног тракта (енгл. *respiratory tract infection*, RTI). *Belmont* и сарадници (402) су испитивали повезаност између SNPs гена за Gal-3 (*LGALS3*) и нивоа у серуму са RTI и вазооклузивном кризом (енгл. *vaso-occlusive crisis*, VOC) код деце са SCA. У овом истраживању је показано да су варијације нивоа Gal-3 у серуму у вези са SNPs генима +191 и +292 могу представљати фактор осетљивости на учесталост RTI и VOC (402) Ова студија је показала повезаност између *LGALS3* са средњим/ниским нивоима Gal-3 у серуму са вишим FRTI и FVOC код деце са SCA, као и директно са нивоима Gal-3 у серуму, указујући на то да се полиморфизам *LGALS3* може сматрати генетским маркером за предиспозицију за RTI и VOC.

*Борђевић* и сарадници (403) су испитивали ефекте rs2274273 и rs17128183 на генетску осетљивост узнапредовале каротидне атеросклерозе (енгл. *advanced carotid atherosclerosis*, CA) и њених компликација. rs2274273 је издвојен као водећи SNP блока хаплотипа који садржи *LGALS-3* повезан са циркулишућим нивоима Gal-3, док rs17128183 чини потенцијално функционални SNP истог хап-блока. Даље су покушали да утврде да ли ове генетске варијанте имају утицај на експресију *LGALS-3* mRNA у ткиву атеросклеротских плакова каротида код пацијената. Није било статистички значајних повезаности испитиваних генетских варијанти са осетљивошћу на узнапредовалу CA, нити су пронашли било какве повезаности у погледу ултразвучно дефинисаних фенотипова плака (403). Показало се да је релативна експресија *LGALS-3* mRNA била значајно већа код носилаца ретких алела ( $P = 0,039$ ) за обе генетске варијанте. Ови резултати сугеришу да, иако rs2274273 и rs17128183 немају везе са ризиком од узнапредовалих компликација повезаних са CA или CA, ове генетске варијанте вероватно утичу на нивое експресије *LGALS-3*.

Системска склероза (енгл. *Systemic sclerosis*, SSc) је ретка комплексна болест коју карактерише васкуларно оштећење, аутоимуност и екстензивна фиброза коже и унутрашњих органа. *Cunha* и сарадници (404) су испитивали удруженост између *LGALS3* SNPs и серумских нивоа Gal-3 и SSc и клиничких карактеристика ове болести. Њихови налази су показали већу учесталост за *LGALS3* rs4652 хетерозиготног генотипа код пацијената са SSc него код здравих контрола. Ова повезаност је била укључена у скоро двоструко повећање ризика од развоја SSc. Њихови резултати су показали ниску концентрацију Gal-3 у серуму везану за полиморфни генотип C/C *LGALS3* rs4652, и код пацијената и код здравих контрола, што је потврђено првим генерализованим линеарним моделом (енгл. *Generalised Linear Model*, GLM). Пронашли су више нивое Gal-3 у контролној групи са G/T него са T/T генотипом за *LGALS3* rs1009977 без разлике за пацијенте са SSc. Што се тиче нивоа Gal-3 у серуму, нису пронашли разлике између пацијената са SSc и здраве контролне групе, као ни повезаност између серумских Gal-3, SSc подгрупа и клиничких манифестација (404). Такође, није

пронађена повезаност између Gal-3 и HAQ, SHAQ и модификованог Роднан скорa коже. Нивои Gal-3 у серуму код пацијената са SSc разликују се у литератури. *Taniguchi* и сарадници су (405) су открили ниже нивое Gal-3 код пацијената са дифузном SSc у поређењу са контролном групом. Такође, примећено је да су пацијенти са трајањем болести краћим од једне године имали ниже нивое Gal-3 од пацијената са дужим трајањем болести и здравим контролама. Поред тога, у подскубини dcSSc, пронађена је позитивна корелација између модификованог Роднан скорa коже и Gal-3, а пацијенти са SSc са улкусима и повишеним систолним притиском десне коморе имали су виши ниво Gal-3 у серуму. Дакле, Gal-3 би могао да допринесе модулацији имунског одговора и настанку фиброзе коже (405). С друге стране, извештај турских истраживача (406) је открио ниже нивое Gal-3 у контролној групи од пацијената са SSc и није било повезаности између серумског Gal-3 и клиничких манифестација. Треба напоменути да су студије представиле неке међусобне разлике у погледу броја пацијената и генетског наслеђа.

## 2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

### 2.1. ЦИЉ СТУДИЈЕ

Основни циљ овог истраживања је да се испита улога полиморфизма гена за галектин 3 на прогресију хроничне бубрежне инсуфицијенције као и повезаност полиморфизма гена за галектин 3 са развојем кардиоваскуларних и других компликација код пацијената који су на хемодијализи.

У том циљу поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Одредити ниво биохемијских параметара у системској циркулацији пацијената на хемодијализи (CRP, протеински статус, паратхормон, уреа, креатинин).
2. Одредити учесталост полиморфизама различитих генотипова rs4644, rs4652 и rs11125 гена за галектин 3 код пацијената на хемодијализи и здравих контрола методом *real-time* PCR.
3. Испитати учесталости различитих генотипова rs4644, rs4652 и rs11125 гена за галектин 3 код пацијената на хемодијализи са различитим примарним болестима које су довеле до хроничне бубрежне инсуфицијенције (дијабетес мелитус, хипертнезија, полицистични бубрези).
4. Испитати корелацију између различитих генотипова rs4644, rs4652 и rs11125 гена за галектин 3 и појаве кардиоваскуларних компликација мерењем нивоа NT-proBNP и тропонина.
5. Утврдити корелацију између свих клиничких, генетских и биохемијских варијабли.

### 2.2. ХИПОТЕЗЕ СТУДИЈЕ

1. Учесталост генотипова и алела гена за галектин 3 код пацијената на хемодијализи биће различит у односу на учесталост истих генотипова код здравих особа.
2. Учесталост генотипова и алела гена за галектин 3 код пацијената на хемодијализи биће различит у односу на примарну болест.
3. Очекује се постојање позитивне корелације између учесталости појединих генотипова и алела за галектин 3 и појаве кардиоваскуларних компликација.
4. Очекује се постојање позитивне корелације између бар неких клиничких, генетских и биохемијских варијабли.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Све особе које су учествовале у студији дале су писмени информисани пристанак, а узорци крви су узети у складу са протоколима одобреним од стране Етичког комитета Клиничког центра Крагујевац, Србија (бр. 01/20-859, датум 4. децембар 2020). Студија је укључивала пацијенте са НРИз централне Србије, дијагностикована и лечена на Клиници за нефрологију и Центру за хемодијализу, Клинички центар Крагујевац, Србија. Поред тога, у студијама генотипизације, такође су коришћени узорци периферне крви за одређивање стандардних биохемијских параметара релевантних за НРИ. Контролну групу сачињавали су здрави волонтери, добровољни даваоци крви у Заводу за трансфузију крви Клиничког центра Крагујевац. Студија је спроведена у складу са Хелсиншком декларацијом.

#### 3.1. Пацијенти

Студија је обухватила 108 пацијената са ТФРИ и 38 здравих добровољаца усклађених по годинама и полу. Сви пацијенти су имали смањену (JGF <10mL/min/1.73m<sup>2</sup>). Укупно је 58,3% мушкараца и 41,7% жена оболелих од ТФРИ-је. Здраве контроле су чиниле 73,7% мушкараца и 26,3% жена.

Критеријуми за укључивање у студији били су:

1. Најмање 6 месеци лечења хемодијализом
2. Старост преко 18 година
3. Пети стадијум терминалне бубрежне инсуфицијенције (**Табела 1**)
4. Претходно постављена дијагноза дијабетес мелитуса типа 2, или хипертензија или РСО.

Критеријуми за искључивање из студије били су:

1. Терапија хемодијализом краћа од 6 месеци
2. Старост испод 18 година
3. Пацијенти који се дијализирају због малигних или аутоимунских болести

Стадијум	Опис	JGF ml/min/1,73m <sup>3</sup>	Преваленца %
1.	Оштећење бубрега са нормалном или повећаном JGF	>90	3,3
2.	Оштећење бубрега са благим смањењем JGF	60 – 89	3,0
3.A	Оштећење бубрега са умереним смањењем JGF	45 – 59	4,3
3.B		30 – 44	
4.	Тешко смањење JGF	15 – 29	0,2
5.	Терминална ренална инсуфицијенција	< 15 (или дијализа)	0,2

**Табела 1. Стадијуми хроничне бубрежне инсуфицијенције**

### 3.2. Одређивање серумских концентрација биохемијских параметара

Серумске концентрације биохемијских параметара бубрежне и срчане слабости одређиване су из серума пацијената добијеног у супернатанту након центрифугирања 5 ml пуне крви. Рутинским лабораторијским анализама одређени су комплетна крвна слика, са бројем леукоцита и леукоцитарном формулом паратхормона и албумина, вредности гвожђа, магнезијума, фосфора, натријума, калијума, калцијума као и серумски ниво NT proBNP, тропонин hs, уреје и креатинина пре и после хемодијализе.

### 3.3. Методе молекуларне генетике

Молекуларно-генетске анализе урађене су на Институту за хуману генетику, Медицински факултет Универзитета у Београду. Геномска DNA је изолована из 5 ml периферне крви пацијената методама екстракције DNA на бази раствора соли (407). Генотипови полиморфизама *LGALS3* гена rs4644, rs4652 и rs11125 за сваког пацијента су одређени real-time PCR методом, коришћењем TaqMan probe (TaqMan® SNP есеја са генотипизацију), C\_\_\_7593635\_1\_, C\_\_\_7593636\_30 и C\_\_\_7593637\_10, редом. Све реакције су изведене на real-time PCR машини ABI7500 Real-time system (Applied Biosystems, Foster, CA, USA).

#### Молекулско генетичко тестирање полиморфизма гена за Gal-3

Три најчешћа полиморфизма гена за Gal-3 одређивани су применом RT PCR методе, којом су идентификовани појединачни нуклеотидни полиморфизми (енг. *Single nucleotide polymorphism*, SNP). За тестирање полиморфизама коришћени су TaqMan® есеји (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD*). Нуклеотидне секвенце које су садржале есеји приказане су у Табели 2.

Алели	Секвенце
rs4644	C___7593635_1_
rs4652	C___7593636_30
rs11125	C___7593637_10

Табела 2. Нуклеотидне секвенце есеја

## Узорковање периферне крви за изолацију DNA

Узимана је по једна епрувета за изолацију DNA. Од пацијената је узимано 5ml периферне крви на цитрату и чувана је неколико дана на +4°C до изолације DNA.

## Изоловање DNA молекула из лимфоцита периферне крви методом исољавања

Изолација DNA је вршена методом исољавања ("salting out) по *Milleru* (407). У првом кораку извршено је лизирање еритроцита мешањем исте запремине лизинг бафера и узорковане крви, инкубацијом на +4°C у трајању од 20 минута. Инкубирана крв је потом центрифугирана 15 минута на 2000 (RPMI), добијени супернатант се одбацивао, а талог ресуспендовао у 5 ml физиолошког пуфера. Затим се узорак поново центрифугирао 15 мин на 2000 (RPMI) и исти поступак се понављао 2-3 пута све док талог не побели. Након последњег "испирања" супернатант се одбацивао а талогу додавало 3 ml пуфера А, 50 μl 10% протеиназе К и 200μl 10% SDS (Na-додецисулфат). Смеша се потом енергично ресуспендовала Пастеровом пипетом и инкубирана је на 37°C током ноћи. Следећег дана инкубираној смеси додат је 1 ml 6M NaCl-а након чега је уследило центрифугирање у трајању од 15 мин на 3000 RPMI. По завршеном центрифугирању супернатант се преносио у чисту епрувету и центрифугирао 15 минута на 4000 RPMI. Након другог центригуирања супернатант се пажљиво пресипао у чисту градуисану епрувету у коју се додавао исти волумен изопропанола. Благим мешањем смеше у епрувети издвајала се DNA у виду беличастог кончића. Изолована DNA се пажљиво сакупљала врхом стакленог штапића који се потом потапао 30 секунди у 70% етанол а затим сушио 40 минута на собној температури. Осушени узорак геномске DNA се растварао у 300 μl редестиловане воде и чувао тако растворен на собној температури до коначне анализе. Реагенси коришћени за изолацију DNA методом исољавања приказани су у Табели 3.

Пуфер за лизу *1	Физиолошки пуфер	Пуфер А	ТЕ пуфер
0,32M saharoza	0,075 M NaCl	10 mM TRIS HCl *2	10 mM TRIS HCl *2
10 mM TRIS HCl *2	0,025M EDTA pH 8	400 ml NaCl	1mM EDTA
1% TRITON x 100		2 mM EDTA	
5 mM MgCl2			

Табела 3. Састав пуфера за изолацију геномске DNA методом исољавања

## Одређивање концентрације и чистоће изоловане DNA

Узорак од 8  $\mu\text{l}$  изоловане DNA наношен је у микрокивету *Gene Quant Pro Calculatora* (*LKB Pharmacia, Uppsala, Шведска*), а затим су читаване вредности апсорбанције на  $\lambda=260$  и  $\lambda=280$  nm.

**$\text{DNA}_{\text{conc}} = A_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g/mL} \times \text{разблажење}$**

Вредности количника апсорбанција на  $\lambda=260$  nm и  $\lambda=280$  nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) даје информацију о чистоћи добијеног узорка. Уколико је однос апсорбанција између 1,8 и 2,0 узорак је високе чистоће, а уколико је тај однос мањи од од 1,8 у узорку постоји контаминација протеинима и понављана је изолација DNA из узорака крви. Изоловане DNA су по правилу биле концентрације од око 20 ng/ $\mu\text{l}$ . Из изоловане DNA узимани су узорци од 500 ng и допуњавани водом до запремине од 125  $\mu\text{l}$  чиме су добијана разблажења од 4 ng/ $\mu\text{l}$  која су коришћена за одређивање полиморфизма. Остатак DNA је чуван на  $-20^\circ\text{C}$ .

## Анализа полиморфизма rs4644, rs4652 и rs11125 гена за Gal- 3

Приликом анализе овог полиморфизма коришћено је 10.5  $\mu\text{l}$  реакционе смеше која за сваки узорак садржала следеће компоненте:

- 2  $\mu\text{l}$  HOT FIREPol Probe qPCR Mix Plus ROX (5X)
- 0,3125  $\mu\text{l}$  20X SNP Genotyping Assay
- 0,5  $\mu\text{l}$  DNK (1-20ng/ $\mu\text{l}$ )
- 7,6875 ампулиране  $\text{H}_2\text{O}$ - REDE

За детекцију и анализу полиморфизама гена за Gal-3 у геному пацијената са TFRI и здравих контрола коришћени су TaqMan®есеји (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD*), метода коришћењем комерцијално доступних смеша олигонуклеотида и то за Gal-3 rs4644(C\_\_7593635\_1\_); rs4652(C\_\_7593636\_30); rs11125(C\_\_7593637\_10) Амплификација фрагмената DNA Real-time PCR методом вршена је помоћу наведених смеша комерцијалних олигонуклеотида и Maxima™ Probe qPCR 2X Master Mix, (*Fermentas, Vilnius, Litvanija*), узимајући у обзир препоруке произвођача реагенса. Укратко, амплификација је вршена у оптичким плочама за PCR, формата 8 x 12 бунарчића (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD*), у које су сипане финалне реакционе смеше. Плоче су затим затваране лепљењем оптичког филма (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD*), кратко центрифугиране на 1500g и смештене у термоблок 7500 (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) у коме је и извршена амплификација. Док су добијени резултати анализирани применом софтвера *Applied Biosystems 7500 software v2.0.6*.

Услови амплификације били су:

- активација HOT FIREPol DNA полимеразе 10 минута на  $95^\circ\text{C}$
- 40 циклуса од по 2 корака:
- денатурација 15 секунди на  $95^\circ\text{C}$
- везивање и екстензија прајмера, затим полимеризација 1 минут на  $60^\circ\text{C}$
- завршна екстензија 7 минута на  $72^\circ\text{C}$

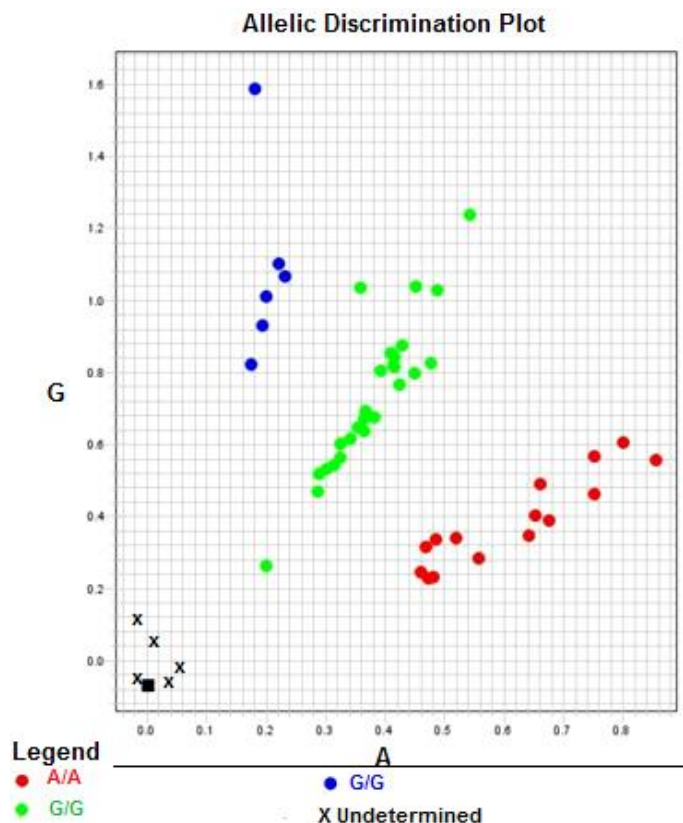


## Реакција ланчане полимеризације у реалном времену

За Реакцију ланчане полимеризације у реалном времену (енг. *Real Time-Polimerase Chain reactions*, RT-PCR) коришћени су конвенционални ТаqМан есеји за генотипизацију полиморфизма гена за Gal-3 који садрже прајмер и алел специфичне олигонуклеотидне пробе. Ове пробе су на 5' крају обележене различитим флуоресцентним бојама које служе као репортер боје (нпр. VIC и FAM), док на 3' крају имају пригушивач, чија је улога блокирање емисије флуоресценције. Приликом везивања прајмера у току реакције, долази и до везивања једне од проба. Потом, када Таq полимераза додаје нове нуклеотиде, проба се уклања 5'-3' егзонуклеазном активношћу ензима. Прво долази до одвајања 5' нуклеотида са репортером, па се самим тим удаљава од пригушивача што за резултат даје флуоресценцију боје коју апарат региструје. Интензитет флуоресценције расте из циклуса у циклус па је могуће пратити динамику PCR реакције у реалном времену.

### Интерпретација резултата

Овом методом детектован је полиморфизам у гену за Gal-3 који потиче од разлике у једном једином нуклеотиду између две алелне форме. У ту сврху коришћене су за један полиморфизам коришћене по две ТаqМан пробе које се разликују у једној бази од интереса и обложене су различитим бојама, те емитују различиту фреквенцију. Уколико апарат детектује једну боју-присутан је један алел (хомозигот); уколико детектује другу боју-присутан је други алел (хомозигот); док детекција обе боје означава присуство хетерозигота (Слика 5).



Слика 5. Пример приказа SNP резултата применом ТаqМан есеја

### 3.4. Статистичка анализа

За поређење средњих вредности различитих клиничких параметара, између случајева и контрола, коришћен је *Mann Whitney* тест. За анализу патологија повезаних са HRI, урађен је Фишеров тест. Запажене учесталости генотипова у контролама су тестиране *Hardy-Weinberg* еквилибријумом коришћењем *Chi-square* теста. Односи шансе (енгл. *Odds ratios* (OR) и 95% интервали поверења (енгл. *confidence intervals* (95% CI) за повезаност између генотипова и HRI, придружених фенотипова и клиничких параметара конвертованих у бинарне варијабле процењени су логистичком регресијом, док је линеарна регресија коришћена за континуиране варијабле. Анализе су рађене на основу два модела, један без прилагођавања и други који је прилагођен узрасту и полу. Статистичка значајност је одређена P- вредношћу нижом од 0,05. Статистичке анализе су обављене у SPSS програму верзије 16.0 (*SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA*), коришћењем одговарајућих статистичких метода. Анализа хаплотипа је извршена коришћењем софтвера *HaploView 4.2* (408). Блокови хаплотипа су процењени методом „Интервали поверења LD”.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Опште карактеристике испитиваних пацијената

Демографске, клиничке и биохемијске карактеристике испитиваних пацијената сумиране су у Табели 4. Просечна старост укључених пацијената са TFRI (63 мушкарца, 45 жена) била је  $63,05 \pm 11,74$  године. Просечна старост 38 здравих контрола (28 мушкараца, 10 жена) била је  $53,5 \pm 15,5$  година. Испитивани пацијенти су били на дијализи дуже од шест месеци, са средњим трајањем дијализе  $5,68 \pm 5,23$  године.

Варијабле	Нормална вредност	Средња вредност $\pm$ стандардна девијација
Старост (године)	>18	63.05 $\pm$ 11.74
Дужина лечења хемодијализом	>6 месеци	5.68 $\pm$ 5.23 година
Пол	мушкарци/жене	63/45
Леукоцити	(3.70-10.0 $10^9/L$ )	7.22 $\pm$ 3.46
Еритроцити	(3.86-5.08 $10^{12}/L$ )	3.74 $\pm$ 1.23
Хемоглобин	(110-157g/L)	102.90 $\pm$ 12.32
Тромбоцити	(135-450 $10^9/L$ )	183.86 $\pm$ 64.03
Гвожђе	(6.6-26.0 $\mu\text{mol}/L$ )	10.78 $\pm$ 5.26
Натријум	(136-145 $\text{mmol}/L$ )	138.72 $\pm$ 2.98
Калијум	(3.4-4.5 $\text{mmol}/L$ )	5.24 $\pm$ 0.82
Калцијум	(2.02-2.65 $\text{mmol}/L$ )	2.27 $\pm$ 0.20
Фосфор	(0.80-1.60 $\text{mmol}/L$ )	1.53 $\pm$ 0.49
Магнезијум	(0.70-1.10 $\text{mmol}/L$ )	1.16 $\pm$ 0.26
Паратиroidни хормон	(120-300 $\text{pg}/\text{ml}$ )	234.94 $\pm$ 271.53
Албумин	(35-52 $\text{g}/L$ )	36.96 $\pm$ 3.26
Уреа пре хемодијализе	(3,0-8,0 $\text{mmol}/L$ )	21.45 $\pm$ 5.06
Уреа након хемодијализе	(3.0-8.0 $\text{mmol}/L$ )	7.59 $\pm$ 2.93
Креатинин пре хемодијализе	(49-106 $\mu\text{mol}/L$ )	772.59 $\pm$ 512.59
Креатинин након хемодијализе	(49-106 $\mu\text{mol}/L$ )	324.36 $\pm$ 106.99
NTproBNP пре хемодијализе	( $\geq$ 7200 $\text{pg}/\text{mL}$ )	17491.20 $\pm$ 34341.10
NTproBNP након хемодијализе	( $\geq$ 7200 $\text{pg}/\text{mL}$ )	14575.93 $\pm$ 34478.69
Тропонин пре хемодијализе	мушкарци $\leq$ 0.03 жене $\leq$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01
Тропонин након хемодијализе	мушкарци $\leq$ 0.03 жене $\leq$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01
Јачина гломерулске филтрације	0-15 $\text{ml}/\text{min}$	10.94 $\pm$ 3.37

**Табела 4. Демографске, клиничке и биохемијске карактеристике пацијената са TFRI укљученим у студију. Континуиране варијабле су представљене као средња вредност  $\pm$  SD, TFRI, терминални стадијум реналне инсуфицијенције; NTproBNP- енгл. *N-terminal proBrain Natriuretic Peptide*, Н-терминални прохормон можданог натриуретичког пептида.**

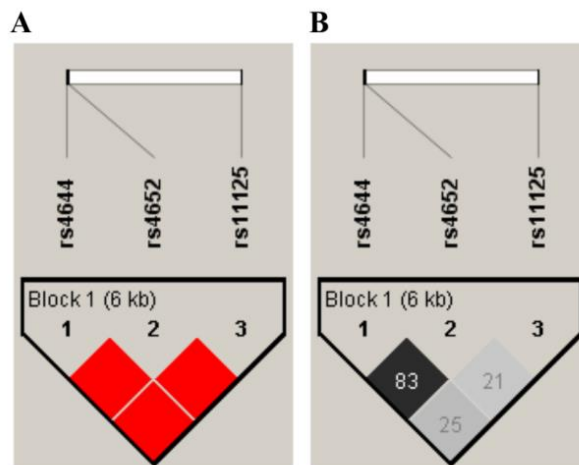
#### 4.2. Студија генетске повезаности

Учесталости алела и генотипова анализираних полиморфизама Gal-3 гена упоређивани су између пацијената са TFRI и контролне групе и сумирани су у **Табели 5**. Утврђене учесталости алела и генотипова анализираних полиморфизама Gal-3 гена у контролној групи пацијената су износиле (rs4644: 16 (42.1%) CC, 15 (39.5%) CA и 7 (18.4%) AA генотипе; rs4452: 16 (42.1%)AA, 12 (31.6%)AC, 10 (26.3%)CC; rs11125: 30 (78.9%)AA, 8 (21.1%) AT) док су у групи TFRI пацијената износиле (rs4644: 48 (45.3%)CC, 46 (43.4%) CA, 12 (11.3%) AA; rs4452: 44 (41.5%)AA, 45 (42.5%)AC, 17 (16%)CC; rs11125: 84 (79.2%)AA, 20 (18.9%) AT, 2 (1.9%)TT). Није било значајне разлике између учесталости алела полиморфизама Gal-3 код пацијената са TFRI и контролних субјеката ( $p > 0,05$ ).

Полиморфизам Gal-3	Контроле n= број (%)	TFRI пацијенти n = број (%)	p вредност
<b>rs4644</b>			
CC	16 (42.1)	48 (45.3)	0.540
CA	15 (39.5)	46 (43.4)	
AA	7 (18.4)	12 (11.3)	
<b>rs4452</b>			
AA	16 (42.1)	44 (41.5)	0.299
AC	12 (31.6)	45 (42.5)	
CC	10 (26.3)	17 (16)	
<b>rs11125</b>			
AA	30 (78.9)	84 (79.2)	0.675
AT	8 (21.1)	20 (18.9)	
TT	0 (0)	2 (1.9)	

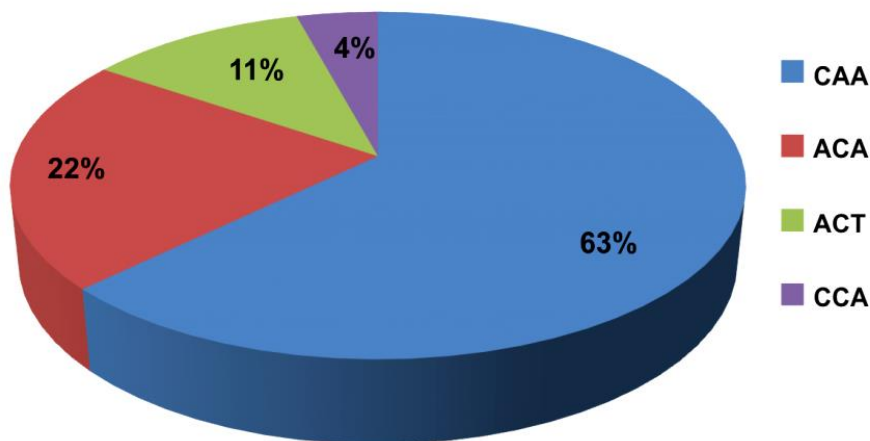
**Табела 5. Учесталост алела полиморфизма Gal-3 код пацијената са TFRI и здравих контрола.** Приказане су учесталости алела и генотипова анализираних полиморфизама Gal-3 гена rs4644, rs4452 и rs11125 и уочено је да није било статистички значајне разлике између учесталости алела полиморфизама Gal-3 код пацијената са TFRI и здравих пацијената ( $p > 0,05$ ).

Додатно, извршена је анализа хаплотипа гена LGALS3 (rs4644, rs4652 и rs11125). Вредности  $D'$  (нормализовани LD коефицијент) и  $r^2$  (коефицијент корелације) приказане су на Слици 6.



**Слика 6. Шематски приказ LD са вредностима  $D'$  (а) и  $r^2$  (б) међу анализираним полиморфизмима LGALS3 гена (rs4644, rs4652 и rs11125) код пацијената са бубрежном болешћу. (А) Интензивна црвена боја означава вредност  $D'= 100$  за LOD вредности  $> 2$ . Смањење интензитета црвене је пропорционално смањењу вредности  $D'$ . (Б) Црна боја је присутна на вредности  $r^2 = 100$ . Интензитет сиве боје је пропорционалан вредностима  $r^2$ , где бела боја одговара вредности  $r^2 = 0$ .**

Анализа је показала да је присутан хаплотипски блок између три испитивана полиморфизма (rs4644, rs4652 и rs11125). Учесталост хаплотипова присутних код пацијената приказана је на **Слици 7**, и показује да је највећа учесталост присутна код САА хаплотипа (63%), потом следи учесталост хаплотипа АСА (22%), онда учесталост хаплотипа АСТ (11%) и хаплотип ССА са најмањом учесталошћу (4%).



**Слика 7. Учесталост хаплотипова присутних код пацијената.** Највећа учесталост се уочава код САА хаплотипа, са чак 63%, затим следи учесталост хаплотипа АСА са 22%, потом учесталост хаплотипа АСТ са 11%, и хаплотип ССА са најмањом учесталошћу од 4%.

#### 4.3. Полиморфизми Gal-3 гена повезани са клиничким/биохемијским параметрима

Пацијенте са TFR1 карактерише дефинисан биохемијски профил који делује као клинички индикатор. Добијени резултати су приказани у **Табели 6**. Као што је наведено, три биохемијска параметра су показала статистичку повезаност са дефинисаним полиморфизмима Gal-3 гена: хемоглобин, JGF и паратиroidни хормон. Штавише, пацијенти са TFR1 са *LGALS3*rs4644 CC ( $p=0.034$ ; OR=4.83; CI 1.12 – 20.82) и rs4652 AA ( $p=0.019$ ; OR =2.86; CI 1.26 – 6.5) генотиповима су имали 5 и 3 пута већи ризик за нижи хемоглобин, респективно (<103 g/L).

Такође, бинарна логистичка регресија је показала да ниска JGF зависи од генотипа *LGALS3*rs11125. Штавише, пацијенти са TFRI са генотипом *LGALS3*rs11125 AA имају око четири пута већи ризик за смањену филтрацију ( $p=0,018$ ; OR=3,73; ЦИ 1,33–10,5). Даље, пацијенти са TFRI са *LGALS3* rs4644 CA ( $p=0.003$ ; OR=3.52; CI 1.58 – 7.88 и rs4652 AC ( $p=0.003$ ; OR =3.63; CI 1.60 – 8.23) генотиповима су имали око 3,5 пута, респективно, већи ризик за виши ниво паратиroidног хормона ( $> 151,1$  pg/mL). За остале биохемијске параметре нисмо открили повезаност ризика са генотиповима *LGALS3*.

Клинички параметри (нормалне вредности) (гранична вредност)	SNP	генотип	Група 1* n (%)	Група 2** n (%)	OR; (95% CI)	p вредност
Хемоглобин (110-157g/L) (<103 g/L)**	rs4644	CC	16 (30.2)	29 (59.2)	3.35; (1.48–7.60)	<b>0.006</b>
		CA+AA	37 (69.8)	20 (20.8)		
	rs4652	AA	15 (28.3)	26 (53.1)	2.86; (1.26-6.5)	<b>0.019</b>
		CA+CC	38 (71.7)	23 (46.9)		
	rs11125	AA	38 (71.7)	42 (85.7)	2.37; (0.87-6.43)	0.138
		AT+TT	15 (28.3)	7 (14.3)		
JGF ( $\leq 15$ mL/min/1.75m <sup>2</sup> ) (<11 mL/min/1.75m <sup>2</sup> )**	rs4644	CC	22 (43.1)	26 (47.3)	1.18; (0.55-2.54)	0.823
		CA+AA	29 (56.9)	29 (52.7)		
	rs4652	AA	20 (39.2)	24 (43.6)	1.2; (0.55-2.60)	0.791
		AC+CC	31 (60.8)	31 (56.4)		
	rs11125	AA	35 (68.6)	49 (89.1)	3.73; (1.33-10.5)	<b>0.018</b>
		AT+TT	16 (31.4)	6 (10.9)		
Паратиroidни хормон (120-300 pg/ml) (>151.1 pg/ml)**	rs4644	CC	32 (60.4)	16 (30.2)	3.52; (1.58-7.88)	<b>0.003</b>
		CA+AA	21 (39.6)	37 (69.8)		
	rs4652	AA	30 (56.6)	14 (26.4)	3.63; (1.60-8.23)	<b>0.003</b>
		AC+CC	23 (43.4)	39 (73.6)		
	rs11125	AA	46 (86.8)	38 (71.7)	2.59; (0.96-7.01)	0.090
		AT+TT	7 (13.2)	15 (28.3)		

**Табела 6. Биохемијске карактеристике хемодијализованих пацијената класификованих према полиморфизмима гена за Gal-3.**

SNP, полиморфизам једног нуклеотида; OR- енгл. odds ratios, односи шансе; CI, енгл. confidence intervals, интервали поверења; Група 1\* Низак ризик; Група 2\* Висок ризик.

#### 4.4. Учесталост хаплотипова према клиничким и биохемијским параметрима пацијената са TFRI

САА хаплотип је био значајно чешћи код пацијената са дијабетесом (0,796 наспрам 0,570;  $p=0,0029$ ), док је АСА хаплотип био чешћи код пацијената који немају дијабетес (0,259 наспрам 0,093;  $p=0,0102$ ) (Табела 7).

Такође, хаплотип САА је био протективан против хипертензије (0,691 наспрам 0,559;  $p=0,0469$ ). Такође је примећено да је АСТ хаплотип био чешћи код пацијената са ниском JGF (0,167 наспрам 0,064;  $P=0,018$ ). Међу пацијентима са нормалним нивоом РТН, САА хаплотип је био чешћи него код пацијената са нижим РТН (0,708 наспрам

0,547;  $p=0,0157$ ), док је АСТ хаплотип био значајно чешћи код пацијената са ниским РТН (0,160 наспрам 0,066;  $p=0,0302$ ).

Што се тиче нивоа хемоглобина, САА хаплотип је био чешћи код пацијената са ниским нивоом хемоглобина него код пацијената са нормалним нивоом хемоглобина (0,704 наспрам 0,547;  $p=0,0209$ ), док је АСТ хаплотип био чешћи код пацијената са нормалним хемоглобином (0,160 наспрам 0,071).  $p=0,0488$ ) (Табела 7).

хаплотипови	САА	АСА	АСТ	ССА
са DM	0,796	0,093	0,074	0,037
Без DM	0,570	0,259	0,127	0,044
<i>p</i>	<b>0,003</b>	<b>0,010</b>	0,293	0,819
Са НТА	0,559	0,255	0,137	0,049
без НТА	0,691	0,182	0,091	0,036
<i>p</i>	<b>0,047</b>	0,197	0,287	0,648
ниска GFR	0,636	0,245	0,064	0,055
нормална GFR	0,618	0,186	0,167	0,029
<i>p</i>	0,778	0,296	<b>0,018</b>	0,364
висок РТН	0,547	0,245	0,160	0,047
Нормалан РТН	0,708	0,189	0,066	0,038
<i>p</i>	<b>0,016</b>	0,317	<b>0,030</b>	0,733
Нормалан Hgb	0,547	0,264	0,160	0,028
низак Hgb	0,704	0,163	0,071	0,061
<i>p</i>	<b>0,021</b>	0,080	<b>0,049</b>	0,253
PKD не	0,641	0,199	0,115	0,045
PKD да	0,593	0,259	0,111	0,037
<i>p</i>	0,492	0,282	0,867	0,771

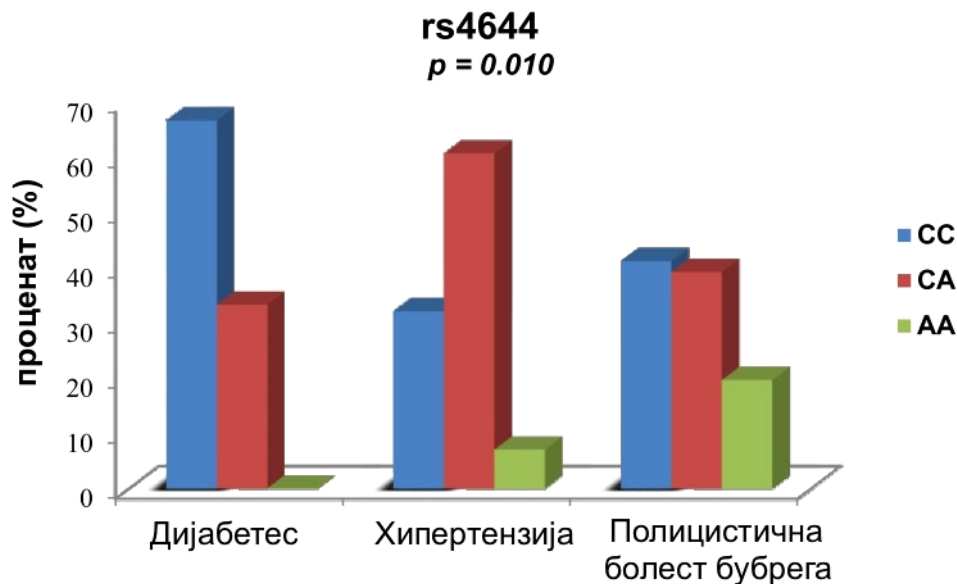
**Табела 7. Учесталост хаплотипова према клиничким и биохемијским параметрима пацијената са TFRI.** Код пацијената са дијабетесом САА хаплотип је био значајно чешћи (0,796 наспрам 0,570;  $p=0,0029$ ), док је САА је био протективан против хипертензије (0,691 наспрам 0,559;  $p=0,0469$ ); АСА хаплотип био чешћи код пацијената који немају дијабетес (0,259 наспрам 0,093;  $p=0,0102$ ). АСТ хаплотип био чешћи код пацијената са ниском JGF (0,167 наспрам 0,064;  $P=0,018$ ); САА хаплотип је био чешћи него код пацијената са нижим РТН (0,708 наспрам 0,547;  $p=0,0157$ ), док је АСТ хаплотип био значајно чешћи код пацијената са ниским РТН (0,160 наспрам 0,066;  $p=0,0302$ ); САА хаплотип је био чешћи код пацијената са ниским нивоом Hgb него код пацијената са нормалним нивоом Hgb (0,704 наспрам 0,547;  $p=0,0209$ ), док је АСТ хаплотип био чешћи код пацијената са нормалним Hgb (0,160 наспрам 0,071).  $p=0,0488$ ) (\* $p<0,05$ ) \*\* $p < 0,01$ ).



#### 4.5. Поређење полиморфизама гена Gal-3 између пацијената са TFRI са различитим врстама примарне болести

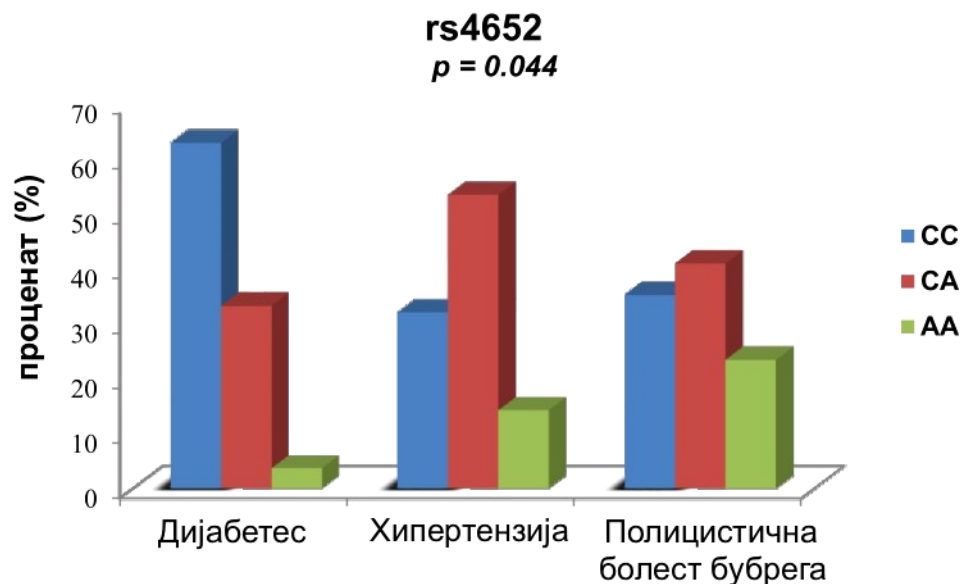
Познато је да пацијенти са TFRI имају истовремено и друге болести, које су повезане са присуством бубрежне инсуфицијенције, било као узрок или као последица. Међу њима можемо навести хипертензију, полицистичну болест бубрега и дијабетес мелитус. У нашој студији приметили смо високу инциденцу хипертензије (49,15%), полицистичне болести бубрега (25,9%) и дијабетес мелитуса (25%) код пацијената са TFRI.

Као што је приказано на **Графикону 1** заступљеност *LGALS3rs4644* CC генотипа статистички значајно је највећа у групи пацијената са дијабетес мелитусом, заступљеност *LGALS3rs4644* CA генотипа у групи пацијената са хипертензијом, док је заступљеност *LGALS3rs4644* AA генотипа највећа код пацијената са полицистичном болешћу бубрега ( $p=0.010$ ).



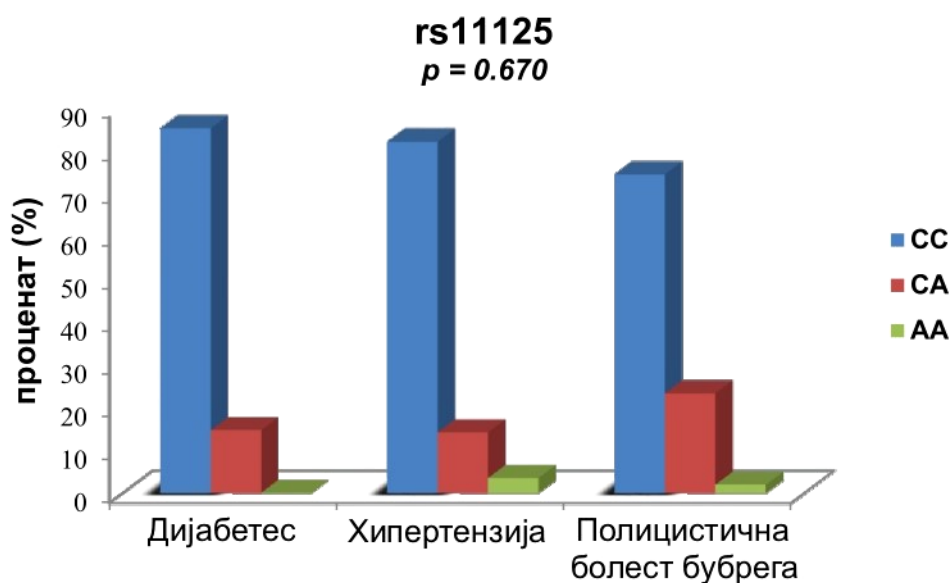
**Графикон 1. Учесталост *LGALS3rs4644* CC, CA, AA генотипова код пацијената са TFRI према примарној болести.** Статистички значајно је највећа заступљеност *LGALS3rs4644* CC генотипа у групи пацијената са дијабетес мелитусом, док је заступљеност *LGALS3rs4644* CA генотипа највећа у групи пацијената са хипертензијом, док је код пацијената са полицистичном болешћу бубрега заступљеност *LGALS3rs4644* AA генотипа највећа ( $p=0.010$ ). (\* $p<0.05$ ) \*\* $p < 0,01$ ).

Такође, за *LGALS3rs4652* на **Графикону 2** показано је да је заступљеност *LGALS3rs4652* CC генотипа статистички значајно највећа у групи пацијената са дијабетес мелитусом, заступљеност CA алела у групи пацијената са хипертензијом, док је заступљеност AA генотипа највећа код пацијената са полицистичном болешћу бубрега ( $p=0.044$ ).



**Графикон 2.** Учесталост *LGALS3rs4652* CC, CA, AA генотипова код пацијената са TFR1 према примарној болести. Учесталост *LGALS3rs4652* CC генотипа је статистички значајно највећа је у групи пацијената са дијабетес мелитусом, док је заступљеност *LGALS3rs4652* CA генотипа највећа у групи пацијената са хипертензијом, док је заступљеност *LGALS3rs4652* AA генотипа најсаступљенија код пацијената са полицистичном болешћу бубрега ( $p=0.044$ ). (\* $p<0.05$ ) \*\* $p < 0,01$ ).

Што се тиче *LGALS3*rs11125 генотипа, на **Графикону 3** се уочава да није било статистички значајне разлике у заступљености било која 3 *LGALS3*rs11125 генотипа међу пацијентима са дијабетесом, хипертензијом и полицистичном болешћу бубрега ( $p=0.670$ ).



**Графикон 3.** Учесталост *LGALS3*rs11125 CC, CA, AA генотипова код пацијената са TFRI према примарној болести. Не постоји статистички значајна разлика у учесталости *LGALS3*rs11125 CC, CA, AA генотипова међу пацијентима са различитом примарном болешћу ( $p=0.670$ ). (\* $p<0.05$ ) \*\* $p < 0,01$ ).

Када су размотрене везе између учесталости алела полиморфизма Gal-3 и патологија повезаних са TFRI, уочене су неке асоцијације. Да би се откриле повезаности између одабраних полиморфизама Gal-3 гена и примарне болести, урађене су главне анализе, користећи и логистичке и моделе линеарне регресије.

Након процене повезаности ризика између *LGALS3* генотипова и клиничких компликација, проучавали смо потенцијалну корелацију између *LGALS3* генотипова и примарних болести (**Табела 8**). Штавише, бинарна логистичка регресија је показала да пацијенти који су имали *LGALS3*rs4644 CC и rs4652 AA генотип, имали су 3.2 и 10 пута већи ризик од развоја дијабетес мелитуса ( $p=0.018$ ; OR=3.27; CI 1.30 – 8.60 и  $p=0.017$ ; OR=3.27; CI1.32 - 8.13, респективно). Додатно, бинарна логистичка регресија је

показала да пацијенти са *LGALS3* rs4644 AA генотипом имају 6,5 пута мањи ризик од развоја артеријске хипертензије ( $p= 0.013$ ; OR=6.46; CI 1.34-31.13). Није било повезаности ризика између различитих типова примарне болести и генотипова *LGALS3* rs11125 ( $p>0.05$ ).

Клинички параметри	SNP	Генотип	не н (%)	да н (%)	OR; (95% CI)	p вредност
Дијабетес мелитус	rs4644	CC	30 (38,0)	18 (66,7)	3.27; (1.30–8.60)	<b>0.018</b>
		CA+AA	49 (69.8)	9 (20.8)		
	rs4652	AA	27 (34.2)	17 (63.0)	3.27; (1.32-8.13)	<b>0.017</b>
		CA+CC	52 (65.8)	10 (37.0)		
	rs11125	AA	61 (77.2)	23 (85.2)		0.543
AT+TT		18 (22.8)	4 (14.8)			
Хипертензија	rs4644	CC+CA	53 (96.4)	41 (80.4)	6.46; (1.34-31.13)	<b>0.013</b>
		AA	2 (3.6)	10 (19,6)		
	rs4652	AA+AC	50 (90.9)	39 (76.5)		0.078
		CC	5 (9.01)	12 (23.5)		
	rs11125	AA	46 (83.6)	38 (74.5)		0.359
AT+TT		9 (16.4)	13 (25.5)			
Полицистична болест бубрега	rs4644	CC	39 (50.0)	9 (32.1)		0.159
		CA+AA	39 (50.0)	19 (67.8)		
	rs4652	AA	35 (44.9)	9 (32.1)		0.342
		AC+CC	43 (55.1)	19 (67.9)		
	rs11125	AA	61 (78.2)	23 (82.1)		0.862
AT+TT		17 (21.8)	5 (17.9)			

**Табела 8. Дистрибуција учесталости и ризик повезаности Gal-3 генотипова и алела међу испитиваним групама. SNP, енгл. *single nucleotide polymorphism*, полиморфизам једног нуклеотида; OR, енгл. *odds ratios*, односи шансе; CI, енгл. *confidence intervals*, интервали поверења.**

## 5. ДИСКУСИЈА

У овој студији смо по први пут истраживали три SNP полиморфизма *LGALS3* гена и њихову корелацију са нивоом хемоглобина, JGF, нивоом паратироидног хормона, дијабетес мелитусом и артеријском хипертензијом.

Прво, наши налази су показали да пацијенти који болују од TFRI-је са генотиповима *LGALS3*rs4644 CC и rs4652 AA имају већи ризик за нижи хемоглобин, виши ниво паратироидног хормона, као и већи ризик за појаву дијабетес мелитуса и артеријске хипертензије.

Мултифакторска етиологија TFRI је добро документована у претходно објављеној литератури. Поред тога, пријављено је да су бројни фактори животне средине, неколико мутација и генетских варијанти повезани са болестима бубрега (409-412).

Разумевање генетских фактора и фактора животне средине који утичу на функцију здравих и болесних бубрега и интеракција између фактора генетске осетљивости и околине може пружити важан увид у физиологију и патофизиологију бубрега. На тај начин се могу открити ранији непознати механизми, и сходно томе, истраживање генетских и еколошких фактора повезаних са HRIи TFRI има потенцијал да идентификује нове терапеутске или превентивне циљеве. Како би се идентификовали недостаци у знању и предложили и одредили приоритети у истраживању HRI, Међународно друштво за нефрологију је у јулу 2016.године одржало састанак међународних стручњака за истраживање HRI (413). Важан напредак у хуманој генетици у протеклој деценији укључује секвенционирање људског генома, одређивање образаца генетичких варијација у популацијама широм света, побољшања генотипизације и технологије масовног паралелног секвенционирања, као и напредак у статистичкој генетици и биоинформатици. Заједно, ови ресурси су довели до открића многих нових гена и генетских варијанти повезаних са болестима (414–417). Студије асоцијација на нивоу генома, као и секвенцирање целог егзома и генома постале су стандардне технике за идентификацију генетских локуса у којима се варијације повезују са сложеним особинама и болестима. Успешно су коришћени у нефрологији за идентификацију генетских варијанти повезаних са етиологијом бубрежних болести, као и са функцијом здравих и болесних бубрега и са откривањем мутација које изазивају моногене бубрежне болести (2,417–419). Тренутно је познато неколико стотина мутација гена које могу изазвати поремећаје фенотипа бубрега, као и десетине генских локуса у којима су уобичајене генетске варијанте повезане са нормалном функцијом бубрега као и са сложеним бубрежним обољењима (419). Иако је сада могуће ефикасно открити нове гене удружене са болестима, као основу за примену открића таквих гена у побољшану превенцију и лечење HRI, остају важни недостаци у разумевању механизма деловања генетских компоненти HRI. Различити фактори животне средине су повезани са развојем HRI (420,421). Неки од ових фактора су представљени као потенцијални узроци HRIу такозваним жаришним тачкама HRI , које су дефинисане као земље, региони, заједнице или етничке припадности са вишом од просечне инциденце HRI(422). У већини жаришта HRI, HRI није узрокована традиционалним узроцима као што су дијабетес или хипертензија (421,423). Упркос сумњивој улози фактора средине, узрочно-

последична веза није демонстрирана у већини региона, па према томе, HRI остаје непознате етиологије и инфекције остају водећи узроци HRI у већини жаришта ове болести (421,422,424). Поред недостатака у истраживању, регулаторна питања, (која често имају основу у политичким и финансијским сукобима интереса) такође доприносе непотпуном разумевању потенцијалне улоге фактора животне средине у HRI и непоштовању међународних уговора и закона (425). Клиничке интервенције су компликоване недостатком приступа здравственој заштити и терапији замене бубрега, недовољним финансијским средствима и недостатком обученог особља, што је често случај са земљама у развоју, где се налази већина жаришта HRI (426).

LGALS3 генотипови су повезани са осетљивошћу на дилатативну кардиомиопатију (10), честе инфекције респираторног тракта и вазооклузивном кризом код деце са анемијом српастих ћелија (401), градусом тумора и прогнозом глиома (427), и хемотерапеутским одговором и прогнозом карцинома плућа (428).

Постоје бројне студије у којима је пронађена статистички значајна повезаност између нивоа Gal-3 и инфламаторних маркера. Статистички значајна повезаност између нивоа Gal-3 и нивоа CRP-а су пријављене код пацијената са дијабетес мелитусом, синдромом X, интерстицијском болешћу плућа и срчаном инсуфицијенцијом (429-432). Ови резултати су у складу са истраживањем *Liao* и сарадника (433) и даље показују сличан тренд код пацијената са ангиографски потврђеном CAD. *Colnot* и сарадници (327) су известили да је одржавање броја гранулоцита током акутног перитонитиса било смањено код Gal-3 *knockout* мишева, што сугерише да је Gal-3 учествовао у контроли резолуције акутног запаљења. *Winter* и сарадници (434) су показали статистички значајну корелацију између нивоа Gal-3 у циркулацији и броја леукоцита код пацијената са превременим инфарктом миокарда. Еозинофили Gal-3 *knockout* мишева су показали значајно смањено котрљање на адхезивним молекулама васкуларних ћелија 1 (енгл. *vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM1) и смањену стабилну адхезију на ICAM1 у *in vitro* условима (435). *Chen* и сарадници (436) су утврдили да патолошке концентрације Gal-3 код пацијената са канцером повећавају експресију адхезионих површинских молекула ендотелних ћелија као нпр. E-selectin и ICAM-1, што је резултирало појачаном активношћу ендотелних ћелија у метастазама. Код пацијената са колоректалним карциномом, *Chen* и сарадници (436) такође су открили да су високи нивои Gal-3 у серуму статистички значајно повезани са високом серумском концентрацијом sICAM1. Подаци *Liao* и сарадника (433) су открили статистички значајну позитивну повезаност између нивоа Gal-3 у циркулацији и sICAM-1 и тренд повезаности између нивоа Gal-3 и sE-selectin-а код пацијената са CAD. Интеракција између Gal-3 и MMP9 била је комплекснија, и утврђено је да су матриксне металопроотеиназе (енгл. *Matrix metalloproteinases*, MMPs), укључујући MMP2 и MMP9, способне да ефикасно цепају Gal-3, модулишући на тај начин биолошку функцију Gal-3; сходно томе, Gal-3 делује као нисходни регулатор функције MMP9 (437). Показало се да је цепање галектина активан процес током прогресије тумора и да се може користити као нови сурогат маркер за активност MMP-а у расту карцинома дојке (438). Насупрот томе, Gal-3 је олакшао покретљивост туморских ћелија индукујући активност MMP-а, укључујући MMP9 (439), а супресија гена за Gal-3 значајно смањује mRNA и нивое MMP9 протеина (440). Једна студија је сугерисала да експресија MMP9 може бити индукована Gal-3

активирањем p38 MAPK сигналним путем (441). Дакле, постоје двосмерне интеракције између Gal-3 и MMP9, наглашавајући сложеност асоцијација између Gal-3 и MMP9. Сви поменути резултати сугеришу да Gal-3 може учествовати у вишеструким запаљенским процесима кроз молекуларне механизме који се односе на његову интеракцију са овим инфламаторним биомаркерима. У GWAS белаца, *de Boer* и сарадници (7) су открили да је rs2274273 био водећи SNP у LGALS3 локусу за циркулишуће нивое Gal-3 у релативно здравој популацији. Значајно нижи нивои Gal-3 су такође били удружени са ретким алелима LGALS3 генотипова, укључујући rs4644, rs4652 и rs2274273 у популацијама са болестима као што су реуматоидни артритис, анемија српастих ћелија и дилатативна кардиомиопатија (10, 401, 442). У складу са овим резултатима, показано је да су-Т варијанта LGALS3 rs2274273 генотипа, варијанта А LGALS3 rs4644 генотипа и варијанта С LGALS3 rs4652 генотипа биле повезане са релативно ниским нивоом Gal-3 код пацијената са CAD, а величина ефекта је била слична оној која је евидентна у општој популацији (7). Међутим, *Ђорђевић* и сарадници (402) нашли су знатно високу експресију LGALS3 у ткивима каротидног плака rs2274273 ретких носилаца алела са узрапредовалом атеросклерозом (402). Могуће објашњење за ову неслагање је да нивои mRNA и протеина можда нису у доброј корелацији (443). Друга могућност је да је величина узорка била релативно мала у Ђорђевићевој студији, што је дало само гранични значај за повезаност. У бразилској студији мешовитог порекла (*European, African and Amerindian Contribution*), нивои Gal-3 у серуму су повезани са rs4644 и rs4652 генотиповима. rs4644 CC је био повезан са вишим нивоима Gal-3, а затим СА и коначно АА генотип и rs4652 АА генотип је био повезан са вишим нивоима, а затим АС и СС генотип (401). Ови резултати указују на то LGALS3 SNP генотипови су значајно повезани са циркулишућим нивоима Gal-3 и могу даље утицати на инфламаторни процес различитих болести повезаних са инфламацијом, у нашем испитивању TFRI, с обзиром да је патогенетски значај системске/локалне хронична инфламације основа читаве патофизиологије TFRI-је.

Такође, напред напоменута студија је показала да су два гена *LGALS3* са SNP (rs4644 и rs4652) повезана са променама нивоа протеина (7) и могу променити циркулишући садржај Gal-3, али се мање зна о овим генетским варијацијама у вези са HRI или TFRI.

Међутим, нека ограничења треба узети у обзир приликом одређивања нивоа Gal-3 у серуму. Наиме, поновљена мерења, мерења у више временских тачака, могу пружити боље информације о ризику од каснијих клиничких исхода. Поред тога, генетске варијације rs4644 могу утицати на резултате тестова. Варијанта rs4652 је повезана са нивоом експресије Gal-3 и доказано је да када се алел А промени у С, rs4652 мења треонин у пролин на остатку 98, што доводи до неправилне секреције Gal-3 (442).

Током шеснаестогодишње студије коју су спровели *Rebholz* и сарадници (389) показано је да су повишене вредности Gal-3 у серуму значајно повезане са инцидентима у раним и касним стадијумима бубрежне болести у разноликој популацији са очуваном функцијом бубрега и без срчане инсуфицијенције, посебно међу онима са хипертензијом (389).

Две претходне студије су испитивале проспективну везу између Gal-3 и инцидентне TFR1. Налази *Rebholz* и сарадника (389) су у складу са *Framingham Offspring* студијом (n = 2450), у којој су виши нивои Gal-3 били повезани са инцидентном TFR1, као и брзим опадањем JGF током 10 година праћења, чак и након што се узме у обзир старост, дијабетес, хипертензија, протеинурија и почетна JGF (14). Насупрот томе, у кардиоваскуларној студији (n = 2763), почетни Gal-3 је проспективно повезан са смањеном JGF (<60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>) током 7 година праћења у неприлагођеним анализама, али није био статистички значајан у прилагођеним анализама (старост, пол, раса, основна JGF, индекс телесне масе, систолни крвни притисак, лекови за хипертензију, дијабетес, пушење, LDL, HDL, преовлађујућа кардиоваскуларна болест, тропонин Т и NT-proBNP) или када се користе алтернативни исходи (тј. континуирани проценат пада JGF; пад JGF за 30% током 3-4 године праћења) (444). Потенцијални разлози за нескладне налазе укључују старију животну доб, веће оптерећење другим факторима ризика (већи удео са историјом кардиоваскуларних болести, виши ниво систолног крвног притиска и виши ниво LDL холестерола), ослабљену функцију бубрега, мању величину узорка, и краћи временски период праћења у Кардиоваскуларној студији у односу на накнадне студије. Показано је да је Gal-3 био повезан са инцидентном TFR1 у укупној студијској популацији ризика од атеросклерозе и да је ова повезаност била јача међу онима са хипертензијом на почетку. Овај налаз је подржан претходним радом који показује да је Gal-3 поред срчане инсуфицијенције, укључен у атеросклеротску болест (коронарна болест срца) (445,446). Gal-3 може довести до TFR1 промовишући развој атеросклеротског плака, а овај процес може бити појачан у окружењу постојећег васкуларног оштећења, посредством своје наводне улоге у стимулацији инфламаторне каскаде, регрутовању макрофага и привлачењу моноцита (362,445,447). Поред уобичајеног основног атеросклеротског пута, сам повишен крвни притисак може довести до фиброзе ткива и бубрега и срца (**Слика 3**). Постоје радови која показује да алдостерон, који игра улогу у RAAS систему тако што регулише задржавање воде и на тај начин утиче на крвни притисак, може стимулирати лучење Gal-3 као интермедијера у фибротичном путу (447–449).

Наши налази су у складу са горњом студијом да су TFR1 пацијенти са генотиповима rs4644 CC имали већи ризик од појаве артеријске хипертензије уз доказ да су особе са хипертензијом посебно подложне ризику од инцидената HRU вези са повишеним нивоима Gal-3 (389).

Поред тога, недавно објављена студија је показала да су нивои Gal-3, али не и *LGALS3* генотипови, повезани са вишеструким нивоима инфламаторних маркера код пацијената са коронарном болешћу. Они су показали да су А варијанта генотипова *LGALS3* rs4644 и С варијанта генотипова *LGALS3* 4652 повезане са релативно ниским нивоима Gal-3 (433). Штавише, подаци су показали да су били статистички значајни пацијенти који имају *LGALS3* rs4652 плућну артеријску хипертензију и миопатију као предикторске варијабле. Поред тога, примећен је пад вредности Gal-3 за *LGALS3* rs4652 A/A, A/C, и C/C генотипова.

Испитивање односа између биохемијских параметара и полиморфизма Gal-3 гена показало је да пацијенти са TFR1 са генотиповима rs4644 CC и rs4652 AA имају 5



односно 3 пута већи ризик за нижи хемоглобин и 3 и 4 пута већи ризик за нижи ниво паратироидног хормона.

Једна студија је показала да су Gal-3 *knockout* мишеви отпорни на дијабетес изазван вишеструко ниским дозама стрептозотоцина (450). Насупрот томе, примећени су виши нивои глукозе наште и повећан ниво масног ткива, телесна тежина, укупно висцерално масно ткиво и нивои инсулина код Gal-3 *knockout* мишева (451). Недостатак Gal-3 убрзао је дијабетес и инфламацију изазвану гојазношћу, као и апоптозу бета ћелија (452); насупрот томе, није било апоптозе бета ћелија у одсуству Gal-3 (453) и прекомерна експресија Gal-3 је показана у ендотелним ћелијама острваца код мишева са дијабетесом изазваним гојазношћу (454). Међутим, прекомерна експресија Gal-3 спречила је уништавање бета ћелија узроковано цитотоксичним ефектом IL-1 $\beta$  (455). Штавише, све већи број доказа је открио да је Gal-3 укључен у патогенезу дијабетичких компликација преко функције овог протеина као рецептора за крајње производе напредне гликације (AGE) и липоксидације (ALE) (456). Пацијенти са гојазношћу показују повишене системске нивое Gal-3 који су у инверзној корелацији са гликолизираним хемоглобином код дијабетеса типа 2 (457). Недавно је показано да Gal-3 позитивно корелира са инсулинском резистенцијом код жена са синдромом полицистичних јајника (458). Недостатак Gal-3 довео је до убрзаног развоја дијабетичке нефропатије (456). Аблација Gal-3 ублажава неалкохолни стеатохепатитис изазван исхраном (456).

Ове студије су објавиле опречне резултате у вези са тим да ли Gal-3 слаби или убрзава дијабетогенезу. По први пут је показана повезаност нивоа Gal-3 у серуму са ново дијагностикованим дијабетесом. Студија коју су спровели *Weigert* и сарадници (457) је показала да су нивои Gal-3 у циркулацији значајно повећани код пацијената са дијабетесом.

Такође, Gal-3 може бити повезан са когнитивним оштећењем код дијабетес мелитуса типа 2, а ниво Gal-3 у серуму може бити нови фактор ризика од умереног когнитивног оштећења код дијабетес мелитуса типа 2 (459).

У недавном истраживању резултати су показали да је учесталост AA генотипа варијанте гена LGALS-3 rs4652 најчешћа међу контролном групом у поређењу са дијабетес мелитусом типа 2 без CAD и дијабетес мелитусом типа 2 са CAD (66,4% > 26,7% > 6,9%), респективно, контрадикторно овом је пронађено код Gal-3 AC и CC генотипова који су били већи међу дијабетес мелитусом типа 2 са CAD него дијабетес мелитусом типа 2 без CAD у односу на контролну групу (39,3% и 62,5% > 36,4% и 35,0% > 24,3% и 2,5%) респективно (460). Ови резултати су показали да је преваленција AC генотипа била значајно већа код код пацијената са дијабетес мелитусом типа 2 са CAD него у друге две групе, што значи да је генотип rs4652 AC био фактор ризика за CAD код пацијената са дијабетес мелитусом типа 2 у Египту (460). Такође, показано је да су нивои експресије Gal-3 гена код дијабетес мелитуса типа 2 код пацијената са CAD били значајно виши него у додатне две групе, а носиоци алела генотипова C (AC+CC, n=220) су имали придружену експресију LGALS-3 mRNA значајно већу од носилаца алела А (AA). Ови налази су у сагласности са налазима *De Boer* и сарадника (7) и *Atabaki* и сарадника (461) који су открили да је варијанта гена Gal-3 (LGALS-3 rs4652) повезана са повећаним нивоима експресије Gal-3.

Штавише, показано је да су циркулишући нивои IL-6 били значајно већи код пацијената са дијабетесом типа 2 који су имали CAD него код пацијената са дијабетесом типа 2 без CAD у односу на контролну групу и такође статистички значајно виши међу носиоцима алела генотипова C (AC+CC) (460). Међутим, претходне студије су показале да су нивои Gal-3 код дијабетеса типа 2 и метаболичког синдрома виши, ефекат Gal-3 је контрадикторан код дијабетичара (456). *Menini* и сарадници (462) су показали значај Gal-3 у започињању и унапређењу дугорочних компликација дијабетеса типа 2 због своје способности да повеже AGEs и ALEs који се акумулирају у циљном органу и врше токсична дејства активирањем проинфламаторних и прооксидативних путева. Међутим, *Iacobini* и сарадници (463) су открили да Gal-3 има улогу у заштити од дијабетичне нефропатије и да се сматра да има директан антиинфламаторни ефекат због функције AGEs и ALEs рецептора. Недавна студија је показала да су старија животна доб, женски пол и веће оштећење бубрежне функције били детерминанте виших концентрација Gal-3 у крви (464). Нижи капацитет вежбања (нижи вршни VO<sub>2</sub>) био је повезан са вишим нивоом Gal-3 и израженијим оштећењем бубрега. Мултиваријабилна регресиона анализа је показала значај бубрежне дисфункције као детерминанте нижег капацитета за вежбање и открила значајну интеракцију између Gal-3 и JGF у односу на вршни VO<sub>2</sub> (464). Додавање Gal-3 прогностичким моделима заснованим на клиничким подацима побољшало је њихову предиктивну моћ за крајњу тачку студије. *Kaplan-Meier*-ова анализа је открила да присуство умерено смањене бубрежне функције са JGF 30-60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> не повећава ризик од нежељеног исхода повезаног са Gal-3 изнад медијане.

Оба главна алела у rs4644 и rs4652 су у вези са високим нивоима Gal-3 у серуму, пошто је јасно показано да је ниво Gal-3 у серуму значајно повећан код дијабетичара и пацијената са предидијабетесом у односу на контролну групу (465). Стога смо у наставку нашег истраживања испитивали корелацију ова два полиморфизма са појавом дијабетеса у нашој популацији. У складу са њиховим налазом наши резултати су показали да пацијенти који су имали генотип *LGALS3* rs4644 CC и rs4652 AA имају 3,2 и 10 пута већи ризик за развој дијабетес мелитуса.

## 6. ЗАКЉУЧАК

Хронична болест бубрега представља један од главних здравствених проблема у целом свету. Најчешћи облик терапије хроничне болести бубрега је хемодијализа. Главни узроци смртног исхода пацијената на дуготрајној хемодијализи су кардиоваскуларне болести и артериосклеротична васкулопатија. Gal-3 је химерни лектин који је везан за  $\beta$ -галактозид, састављен је од 250 аминокиселина и има вишеструке биолошке функције. Недавно је предложен као нови биомаркер срчане инсуфицијенције због његове значајне улоге у фибрози миокарда, инфламацији и адхезији. Поред фиброзе миокарда, повишени ниво Gal-3 може бити повезан са развојем фиброзе других органа, попут бубрега, а може повећати и ризик од развоја хроничне болести бубрега, кроз остале механизме деловања.

Резултати овог истраживања показују да су генотипови *LGALS3* rs4644 CC и rs4652 AA значајно повезани са већим ризиком за ниже вредности хемоглобина, виши ниво паратироидног хормона, као и појаву дијабетес мелитуса и артеријске хипертензије.

У нашем истраживању смо утврдили да није било значајне разлике између учесталости алела полиморфизама Gal-3 код пацијената са TFR1 и контролних субјеката ( $p > 0,05$ ). У овом истраживању испитали смо корелацију између присуства различитих генотипова и алела rs4644, rs4652 и rs11125 полиморфизама гена за Gal-3 код пацијената са терминалном фазом реналне инсуфицијенције код којих је бубрежна слабост настала због дијабетес мелитуса типа 1 и 2, хипертензије и полицистичне болести бубрега и веза полиморфизама гена за Gal-3 са еволуцијом кардиоваскуларних компликација. Затим смо утврдили да постоји разлика у учесталости генотипова и алела полиморфизама гена за Gal-3 између болесника са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом и здравих контрола. Утврдили смо да је учесталост различитих алела и генотипова гена за Gal-3 различита између пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом и здравих контрола, између различитих група пацијената са терминалном бубрежном инсуфицијенцијом као и да постоји повезаност појединих алела са настанком кардиоваскуларних компликација.

Одређивање SNP полиморфизама генотипова *LGALS3* rs4644 CC и rs4652 AA може бити корисно за идентификацију пацијената са TFR1 са лошом прогнозом, посебно за дијабетес мелитус и артеријску хипертензију. Gal-3 може бити мета фармакотерапије за спречавање прогресије и компликација код пацијената са TFR1.

Закључке смо извели на основу следећих резултата

1. Није било значајне разлике између учесталости алела полиморфизама Gal-3 код пацијената са TFRI и контролних субјеката.
2. Анализа хаплотипа гена LGALS3 (rs4644, rs4652 и rs11125) је показала да је присутан хаплотипски блок између три испитивана полиморфизма. Највећа учесталост се уочава код САА хаплотипа, са чак 63%, затим следи учесталост хаплотипа АСА са 22%, потом учесталост хаплотипа АСТ са 11%, и хаплотип ССА са најмањом учесталошћу од 4%
3. Три биохемијска параметра су показала статистичку повезаност са дефинисаним полиморфизмима Gal-3 гена: хемоглобин, JGF и паратиroidни хормон.
4. Пацијенти са TFRI са LGALS3rs4644 CC и rs4652 AA генотиповима су имали 5 и 3 пута већи ризик за нижи хемоглобин, респективно (<103 g/L).
5. Бинарна логистичка регресија је показала да ниска JGF зависи од генотипа LGALS3rs11125, при чему пацијенти са TFRI са генотипом LGALS3rs11125 AA имају око четири пута већи ризик за смањену филтрацију.
6. Пацијенти са TFRI са LGALS3 rs4644 CA генотиповима су имали око 3,5 пута, респективно, већи ризик за виши ниво паратиroidног хормона (> 151,1 pg/mL).
7. Није било повезаности ризика са генотиповима LGALS3 за остале биохемијске параметре.
8. САА хаплотип је био значајно чешћи код пацијената са дијабетесом, док је АСА хаплотип био чешћи код пацијената који немају дијабетес.
9. САА хаплотип је био протективан против хипертензије.
10. АСТ хаплотип је био чешћи код пацијената са ниском JGF.
11. Међу пацијентима са нормалним нивоом РТН, САА хаплотип је био чешћи него код пацијената са нижим РТН, док је АСТ хаплотип био значајно чешћи код пацијената са ниским РТН.
12. САА хаплотип је био чешћи код пацијената са ниским нивоом хемоглобина него код пацијената са нормалним нивоом хемоглобина, док је АСТ хаплотип био чешћи код пацијената са нормалним хемоглобином
13. Код пацијената са TFRI показана је висока инциденца хипертензије (49,15%), полицистичне болести бубрега (25,9%) и дијабетес мелитуса (25%) код пацијената са TFRI.
14. Заступљеност LGALS3rs4644 CC генотипа статистички значајно је највећа у групи пацијената са дијабетес мелитусом, заступљеност LGALS3rs4644 CA генотипа у групи пацијената са хипертензијом, док је заступљеност LGALS3rs4644 AA генотипа највећа код пацијената са полицистичном болешћу бубрега.
15. Заступљеност LGALS3rs4652 CC генотипа статистички значајно највећа у групи пацијената са дијабетес мелитусом, заступљеност СА алела у групи пацијената са хипертензијом, док је заступљеност AA генотипа највећа код пацијената са полицистичном болешћу бубрега.
16. За LGALS3rs11125 на није било статистички значајне разлике у заступљености било која 3 LGALS3rs11125 генотипа међу пацијентима са различитом примарном болешћу.

17. Бинарна логистичка регресија је показала да пацијенти који су имали *LGALS3*rs4644 CC и rs4652 AA генотип, имали су 3.2 и 10 пута већи ризик од развоја дијабетес мелитуса.
18. Додатно, бинарна логистичка регресија је показала да пацијенти са *LGALS3* rs4644 AA генотипом имају 6,5 пута мањи ризик од развоја артеријске хипертензије
19. Није било повезаности ризика између различитих типова примарне болести и генотипова *LGALS3* rs11125.

## СКРАЋЕНИЦЕ

<b>ACTH</b>	адренокортикотропни хормон (енгл. <i>Adrenocorticotropic Hormone</i> )
<b>ADMA</b>	асиметрични диметиларгинин
<b>ADO</b>	аденозин (енгл. <i>Adenosine</i> )
<b>AGEs</b>	крајњи производи гликације (енгл. <i>glycation end products</i> )
<b>AKI</b>	акутно оштећење бубрега (енгл. <i>Acute kidney injury</i> )
<b>AMI</b>	акутни инфаркт миокарда (енгл. <i>Acute miocardial infarction</i> )
<b>Ang-II</b>	ангиотензин II (енгл. <i>Angiotensin II</i> )
<b>ANGPTL2</b>	Протеин сличан ангиопоетину 2 (енгл. <i>angiopoietin-like protein 2</i> )
<b>apoB</b>	Аполипопротеин Б- (енгл. <i>Apolipoprotein B</i> )
<b>BAL</b>	bronхоалвеоларна лаважа
<b>BMP-7</b>	Коштани морфогенетски протеин-7 (енгл. <i>Bone morphogenetic protein 7</i> )
<b>BNP</b>	мождани натриуретски пептид (енгл. <i>Brain natriuretic peptide</i> )
<b>CA</b>	узнапредовала каротидна атеросклероза (енгл. <i>advanced carotid atherosclerosis</i> )
<b>CAD</b>	Коронарна артеријска болест (енгл. <i>Coronary Artery Disease</i> )
<b>CCL2</b>	Це це мотив хемокински лиганд 2 (енгл. <i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i> )
<b>CEACAM1</b>	карциноембрионални антиген повезаног са ћелијском адхезијом 1 (енгл. <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1</i> )
<b>CEACAM8</b>	карциноембрионални антиген повезаног са ћелијском адхезијом 8 (енгл. <i>Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8</i> )
<b>ChLGI</b>	системска/локална хронична инфламација ниског степена (енгл. <i>systemic/local chronic low-grade inflammation</i> )
<b>ChSI</b>	хронична системска инфламација (енгл. <i>chronic systemic inflammation</i> )
<b>CI</b>	интервали поверења (енгл. <i>confidence intervals</i> )
<b>CPK</b>	конгенитални полицистични бубрег (енгл. <i>congenital polycystic kidney</i> )
<b>CRD</b>	специфични домен за препознавање угљених хидрата (енгл. <i>Carbohydrate Recognition Domain</i> )
<b>CRP</b>	Це реактивни протеин (енгл. <i>C reactive protein</i> )
<b>CTGF</b>	фактор раста везивног ткива (енгл. <i>connective tissue growth factor</i> )
<b>CXCL12</b>	Ц-Ц мотив хемокински лиганд 12 (енгл. <i>C-C Motif Chemokine Ligand 12</i> )
<b>CXCL8</b>	Це це мотив хемокински лиганд 8 (енгл. <i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 8</i> )
<b>DAMP</b>	молекуларни обрасци повезани са оштећењем (енгл. <i>damage associated molecular patterns</i> )
<b>DCs</b>	Дендритске ћелије (енгл. <i>Dendritic cells</i> )
<b>DDOST</b>	Долихил-дифосфоолигосахарид--протеин гликозилтрансфераза некаталитичка подјединица (енгл. <i>Dolichyl-Diphosphooligosaccharide--Protein Glycosyltransferase Non-Catalytic Subunit</i> )

<b>DIC</b>	дисеминована интраваскуларна коагулација (енгл. <i>Disseminated intravascular coagulation, DIC</i> )
<b>DM</b>	diabetes mellitus
<b>DMP</b>	мезангијална пролиферација (енгл. <i>mesangial proliferation</i> )
<b>DNMT1</b>	ДНК метилтрансфераза 1 (енгл. <i>DNA methyltransferase 1</i> )
<b>ECM</b>	екстрацелуларни матрикс (енгл. <i>Extracelular matrix</i> )
<b>ECP</b>	Еозинофилни катјонски протеин у крви (енгл. <i>Eosinophilic Cationic Protein</i> )
<b>EMT</b>	Епително-мезенхимална транзиција
<b>FAO</b>	Оксидација масних киселина (енгл. <i>Fatty acid oxidation</i> )
<b>FFA</b>	слободне масне киселине (енгл. <i>free fatty acids</i> )
<b>FMF</b>	Породична медитеранска грозница (enl. <i>Familial Mediterranean fever</i> )
<b>fMLP</b>	Ен формилметионил-леуцил-фенилаланин (енгл. <i>N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine</i> )
<b>FNAB</b>	аспирациона биопсија танком иглом (енгл. <i>Fine Needle Aspiration Biopsy</i> )
<b>FSGS</b>	фокална сегментна гломерулосклероза (енгл. <i>focal segmental glomerulosclerosis</i> )
<b>Gal-3</b>	Галектин 3 (енгл. <i>Galectin 3</i> )
<b>GLM</b>	генерализовани линеарни модел (енгл. <i>Generalised Linear Model</i> )
<b>GLUT4</b>	транспортер глукозе тип 4 (енгл. <i>Glucose transporter type 4</i> )
<b>GM-CSF</b>	фактор стимулације колоније гранулоцита-макрофага (енгл. <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )
<b>GN</b>	Гломерулонефритис
<b>GWASs</b>	студија повезаности на нивоу генома (енгл. <i>genome-wide association studies</i> )
<b>HBME-1</b>	(енгл. <i>Hector Battifora mezothelial epytope-1</i> )
<b>HDL-C</b>	холестерол липопротеина високе густине (енгл. <i>High-density lipoprotein cholesterol</i> )
<b>HF</b>	затајење срца (енгл. <i>Heart failure</i> )
<b>Hgb</b>	хемоглобин
<b>HGF</b>	фактор раста хепатоцита (енгл. <i>hepatocyte growth factor</i> )
<b>HMGB1</b>	протеин групе високе покретљивости Б1 (енгл. <i>High mobility group box 1 protein</i> )
<b>HRI</b>	Хронична ренална инсуфицијенција
<b>HSP70</b>	ген који кодира протеина топлотног шока (енгл. <i>heat shock proteins</i> )
<b>HTA</b>	хипертензија (енгл. <i>Hypertension</i> )
<b>i.p.</b>	интраперитонеално
<b>ICU</b>	јединица интензивна нега (енгл. <i>intensive care unit</i> )
<b>IL-1</b>	интерлеукин 1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	интерлеукин 1 бета
<b>IL-6</b>	интерлеукин 6
<b>JGF</b>	јачина гломерулске филтрације
<b>JNK- c Jun NH2</b>	терминална киназа (енгл. <i>c-Jun NH2-terminal kinase</i> )

<b>KDIGO</b>	Глобални скор побољшања бубрежне болести (енгл. <i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i> )
<b>KIM-1</b>	молекул оштећења бубрега-1 (енгл. <i>kidney damage molecule-1</i> )
<b>KVB</b>	кардиоваскуларне болести
<b>LAMP1,2</b>	протеин мембране повезан са лизозомима 1 и 2 (енгл. <i>Lysosomal-associated membrane protein 1 and 2</i> )
<b>LDL-C</b>	холестерол липопротеина ниске густине (енгл. <i>low-density lipoprotein-cholesterol</i> )
<b>LGALS3</b>	Лектин, везујући галактозид, растворљив, 3 (енгл. <i>Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 3</i> )
<b>MAKE</b>	Критеријум за велики нежељени бубрежни догађај (енгл. <i>Major Adverse Kidney Event criteria</i> )
<b>MAPK</b>	протеин киназа активиране митогеном (енгл. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>MCD</b>	болест минималних промена (енгл. <i>minimal change disease</i> )
<b>MCP</b>	модификованог цитрусног пектина (енгл. <i>modified citrus pectin</i> )
<b>MCP-1</b>	моноцитни хемоатрактантни протеин-1 (енгл. <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> )
<b>Mgat5</b>	манозил (алфа-1,6-)-гликопротеин бета-1,6-Н-ацетил-глюкозаминилтрансферазе (енгл. <i>mannosyl (alpha-1,6)-glycoprotein beta-1,6-N-acetyl-glucosaminyltransferase</i> )
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	Макрофагни инфламаторни протеин 1 $\alpha$ (енгл. <i>Macrophage Inflammatory Protein 1<math>\alpha</math></i> )
<b>MMPs</b>	матриксне металопротеиназе (енгл. <i>Matrix metalloproteinase</i> )
<b>NADPH</b>	никотинамид аденин динуклеотид фосфат
<b>NO</b>	азот-оксид (енгл. <i>nitrogen oxide</i> )
<b>NTproBNP-Н</b>	терминални прохормон можданог натриуретичког пептида (енгл. <i>N-terminal proBrain Natriuretic Peptide</i> )
<b>OR</b>	Односи шансе (енгл. <i>Odds ratios</i> )
<b>OVA</b>	мишји моделу астме изазване овалбумином (енгл. <i>murine model of ovalbumin-induced asthma</i> )
<b>oxLDL</b>	Оксидисани LDL (енгл. <i>oxidized LDL</i> )
<b>PAF</b>	Фактор активације тромбоцита (енгл. <i>Platelet-activating factor</i> )
<b>PCR-RFLP</b>	реакције ланчане полимеризације -полиморфизам дужине рестрикционог фрагмента (енгл. <i>Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
<b>PCT</b>	проксимални тубул (енгл. <i>Proximal tubule</i> )
<b>PDGF</b>	фактор раста тромбоцита (енгл. <i>Platelet-derived growth factor</i> )
<b>PH</b>	перитонеална или програмирана хемодијализа (енгл. <i>programmed hemodialysis</i> )
<b>PKC-<math>\alpha</math></b>	протеин киназа Це алфа (енгл. <i>Protein kinase C alpha</i> )
<b>PKD</b>	полицистична болест бубрега (енгл. <i>polycystic kidney disease</i> )
<b>PPARGC1A</b>	Гама коактиватор 1-алфа рецептора активираног пролифератором пероксизома (енгл. <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i> )
<b>PRKCSH</b>	Протеин киназа Це супстрат 80К-Х (енгл. <i>Protein Kinase C</i> )



	<i>Substrate 80K-H</i>
<b>PRRs</b>	рецептори за препознавање образаца (енгл. <i>pattern recognition receptors</i> )
<b>PTH</b>	паратироидни хормон (енгл. <i>parathyroid hormone</i> )
<b>PTX</b>	пертузис токсин (енгл. <i>pertussis toxin</i> )
<b>RAAS</b>	систем ренин-ангиотензин-алдостерон система (енгл. <i>renin-angiotensin-aldosterone system</i> )
<b>rIR</b>	исхемија/реперфузија (енгл. <i>renal ischemia/reperfusion</i> )
<b>Rpph</b>	рибонуклеаза Пе РНК компонента Н1 (енгл. <i>Ribonuclease P RNA Component H1</i> )
<b>RTI</b>	инфекције респираторног тракта (енгл. <i>respiratory tract infection</i> )
<b>RT-PCR</b>	Реакција ланчане полимеризације у реалном времену (енг. <i>Real Time-Polimerasa Chain reactions</i> )
<b>SAD</b>	Сједињене Америчке државе
<b>SCA</b>	анемија српастих ћелија (енгл. <i>sickle cell anemia</i> )
<b>SDF-1</b>	фактор стромалних ћелија-1 (енгл. <i>Stromal cell-derived factor 1</i> )
<b>sICAM-1</b>	растворљива форма међућелијског адхезионог рецептора 1 (енгл. <i>soluble intercellular cell adhesion molecule-1</i> )
<b>SIR</b>	системски инфламаторни одговор (енгл. <i>Systemic inflammatory response</i> )
<b>SNPs</b>	појединачни нуклеотидни полиморфизми (енгл. <i>single nucleotide polymorphisms</i> )
<b>SSc</b>	Системска склероза (енгл. <i>Systemic sclerosis</i> )
<b>STEMI</b>	Миокардијални инфаркт са естелевацијом (енгл. <i>ST Elevation Myocardial Infarction</i> )
<b>sVCAM-1</b>	растворљива форма васкуларног адхезионог молекула 1 (енгл. <i>soluble vascular cell adhesion molecule-1</i> )
<b>sVEJGF1/2</b>	солубилне форме рецептора васкуларног ендотелног фактора раста 1 и 2
<b>TFRI</b>	терминална фаза реналне инсуфицијенције
<b>TGF-β</b>	трансформишући фактор раста бета (енгл. <i>Transforming growth factor beta</i> )
<b>Th1 CD4+T-CD4+T</b>	помоћнички лимфоцити типа 1 (енгл. <i>CD4+T helper type 1 lymphocyte</i> )
<b>TLR4</b>	рецепторе сличних Толу 4 (енгл. <i>Toll-like receptor 4</i> )
<b>TNF-α</b>	фактор некрозе тумора алфа (енгл. <i>Tumor Necrosis Factor- alpha</i> )
<b>UO</b>	једнострана опструкција уретера (енгл. <i>unilateral ureteral obstruction</i> )
<b>UVB</b>	ултравиолетно Бе зрачење (енгл. <i>Ultraviolet B radiation</i> )
<b>VLDL</b>	Липопротеин веома ниске густине (енгл. <i>Very-low-density lipoprotein</i> )
<b>VOC</b>	вазооклузивна криза (енгл. <i>vaso-occlusive crisis</i> )
<b>WT</b>	дивљег соја мишева (енгл. <i>wild-type</i> )
<b>EV</b>	екстрацелуларне везикуле
<b>ET-1</b>	ендотелин (енгл. <i>Endothelin 1</i> )

## 7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Lo LJ, Go AS, Chertow GM, McCulloch CE, Fan D, Ordoñez JD, Hsu CY. Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2009 Oct;76(8):893-9.
2. O'Seaghda CM, Fox CS. Genome-wide association studies of chronic kidney disease: what have we learned? *Nat Rev Nephrol.* 2011 Dec 6;8(2):89-99.
3. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. *Glycoconj J.* 2002;19(7-9):433-40.
4. Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med.* 2008 Jun 13;10:e17.
5. Domic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Apr;1760(4):616-35.
6. de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail.* 2009 Sep;11(9):811-7.
7. de Boer RA, Verweij N, van Veldhuisen DJ, Westra HJ, Bakker SJ, Gansevoort RT, Muller Kobold AC, van Gilst WH, Franke L, Mateo Leach I, van der Harst P. A genome-wide association study of circulating galectin-3. *PLoS One.* 2012;7(10):e47385.
8. Djordjevic A, Dekleva M, Zivkovic M, Stankovic A, Markovic Nikolic N, Alavantic D, Djuric T. Left ventricular remodeling after the first myocardial infarction in association with LGALS-3 neighbouring variants rs2274273 and rs17128183 and its relative mRNA expression: a prospective study. *Mol Biol Rep.* 2018 Dec;45(6):2227-2236.
9. Fu H, Nie S, Luo P, Ruan Y, Zhang Z, Miao H, Li X, Wen S, Bai R. Galectin-3 and acute heart failure: genetic polymorphisms, plasma level, myocardial fibrosis and 1-year outcomes. *Biomark Med.* 2020 Jul;14(11):943-954.
10. Zhang Y, Wang Y, Zhai M, Gan T, Zhao X, Zhang R, An T, Huang Y, Zhou Q, Zhang J. Influence of LGALS3 gene polymorphisms on susceptibility and prognosis of dilated cardiomyopathy in a Northern Han Chinese population. *Gene.* 2018 Feb 5;642:293-298.
11. Nishiyama J, Kobayashi S, Ishida A, Nakabayashi I, Tajima O, Miura S, Katayama M, Nogami H. Up-regulation of galectin-3 in acute renal failure of the rat. *Am J Pathol.* 2000 Sep;157(3):815-23.
12. Zhang T, Cao S, Yang H, Li J. Prognostic impact of galectin-3 in chronic kidney disease patients: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol.* 2019 Jun;51(6):1005-1011.
13. Tang WH, Shrestha K, Shao Z, Borowski AG, Troughton RW, Thomas JD, Klein AL. Usefulness of plasma galectin-3 levels in systolic heart failure to predict renal insufficiency and survival. *Am J Cardiol.* 2011 Aug 1;108(3):385-90.
14. O'Seaghda CM, Hwang SJ, Ho JE, Vasan RS, Levy D, Fox CS. Elevated galectin-3 precedes the development of CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2013 Sep;24(9):1470-7.
15. Meijers WC, van der Velde AR, Ruifrok WP, Schrotten NF, Dokter MM, Damman K, Assa S, Franssen CF, Gansevoort RT, van Gilst WH, Silljé HH, de Boer RA. Renal handling of galectin-3 in the general population, chronic heart failure, and hemodialysis.

16. Hogas S, Schiller A, Voroneanu L, Constantinescu D, Timar R, Cianga P, Siriopol D, Bob F, Cianga C, Onofriescu M, Gadalean F, Hogas M, Mihaescu A, Bilha SC, Timar B, Kanbay M, Banach M, Covic A. Predictive Value for Galectin 3 and Cardiotrophin 1 in Hemodialysis Patients. *Angiology*. 2016 Oct;67(9):854-9.
17. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*. 2017 Mar 25;389(10075):1238-1252.
18. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2020 Feb 29;395(10225):709-733.
19. Xie Y, Bowe B, Mokdad AH, Xian H, Yan Y, Li T, Maddukuri G, Tsai CY, Floyd T, Al-Aly Z. Analysis of the Global Burden of Disease study highlights the global, regional, and national trends of chronic kidney disease epidemiology from 1990 to 2016. *Kidney Int*. 2018 Sep;94(3):567-581.
20. Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, Pletcher MA, Smith AE, Tang K, Yuan CW, Brown JC, Friedman J, He J, Heuton KR, Holmberg M, Patel DJ, Reidy P, Carter A, Cercy K, Chapin A, Douwes-Schultz D, Frank T, Goettsch F, Liu PY, Nandakumar V, Reitsma MB, Reuter V, Sadat N, Sorensen RJD, Srinivasan V, Updike RL, York H, Lopez AD, Lozano R, Lim SS, Mokdad AH, Vollset SE, Murray CJL. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet*. 2018 Nov 10;392(10159):2052-2090.
21. Ku E, Lee BJ, Wei J, Weir MR. Hypertension in CKD: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis*. 2019 Jul;74(1):120-131.
22. Bowe B, Artimovich E, Xie Y, Yan Y, Cai M, Al-Aly Z. The global and national burden of chronic kidney disease attributable to ambient fine particulate matter air pollution: a modelling study. *BMJ Glob Health*. 2020 Mar 25;5(3):e002063.
23. Cockwell P, Fisher LA. The global burden of chronic kidney disease. *Lancet*. 2020 Feb 29;395(10225):662-664.
24. Silverwood RJ, Pierce M, Thomas C, Hardy R, Ferro C, Sattar N, Whincup P, Savage C, Kuh D, Nitsch D; National Survey of Health and Development Scientific and Data Collection Teams. Association between younger age when first overweight and increased risk for CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Apr;24(5):813-21.
25. Zarantonello D, Rhee CM, Kalantar-Zadeh K, Brunori G. Novel conservative management of chronic kidney disease via dialysis-free interventions. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2021 Jan;30(1):97-107.
26. Cano N, Fernandez JP, Lacombe P, Lankester M, Pascal S, Defayolle M, Labastie J, Saingra S. Statistical selection of nutritional parameters in hemodialyzed patients. *Kidney Int Suppl*. 1987 Oct;22:S178-80.
27. Song MK. Quality of Life of Patients with Advanced Chronic Kidney Disease Receiving Conservative Care without Dialysis. *Semin Dial*. 2016 Mar-Apr;29(2):165-9.
28. Bello AK, Levin A, Lunney M, Osman MA, Ye F, Ashuntantang GE, Bellorin-Font E, Benghanem Gharbi M, Davison SN, Ghnaimat M, Harden P, Htay H, Jha V, Kalantar-Zadeh K, Kerr PG, Klarenbach S, Kovesdy CP, Luyckx VA, Neuen BL, O'Donoghue D, Ossareh S, Perl J, Rashid HU, Rondeau E, See E, Saad S, Sola L, Tchokhanelidze I, Tesar V, Tungsanga K, Turan Kazancioglu R, Wang AY, Wiebe N, Yang CW, Zemchenkov A, Zhao MH, Jager KJ, Caskey F, Perkovic V, Jindal KK, Okpechi IG,

- Tonelli M, Feehally J, Harris DC, Johnson DW. Status of care for end stage kidney disease in countries and regions worldwide: international cross sectional survey. *BMJ*. 2019 Oct 31;367:l5873.
29. Kurella Tamura M, Desai M, Kapphahn KI, Thomas IC, Asch SM, Chertow GM. Dialysis versus Medical Management at Different Ages and Levels of Kidney Function in Veterans with Advanced CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Aug;29(8):2169-2177.
  30. Kalantar-Zadeh K, Kovesdy CP, Streja E, Rhee CM, Soohoo M, Chen JLT, Molnar MZ, Obi Y, Gillen D, Nguyen DV, Norris KC, Sim JJ, Jacobsen SS. Transition of care from pre-dialysis prelude to renal replacement therapy: the blueprints of emerging research in advanced chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Apr 1;32(suppl\_2):ii91-ii98.
  31. Thomas B, Matsushita K, Abate KH, Al-Aly Z, Ärnlöv J, Asayama K, Atkins R, Badawi A, Ballew SH, Banerjee A, Barregård L, Barrett-Connor E, Basu S, Bello AK, Bensenor I, Bergstrom J, Bikbov B, Blosser C, Brenner H, Carrero JJ, Chadban S, Cirillo M, Cortinovis M, Courville K, Dandona L, Dandona R, Estep K, Fernandes J, Fischer F, Fox C, Gansevoort RT, Gona PN, Gutierrez OM, Hamidi S, Hanson SW, Himmelfarb J, Jassal SK, Jee SH, Jha V, Jimenez-Corona A, Jonas JB, Kengne AP, Khader Y, Khang YH, Kim YJ, Klein B, Klein R, Kokubo Y, Kolte D, Lee K, Levey AS, Li Y, Lotufo P, El Razek HMA, Mendoza W, Metoki H, Mok Y, Muraki I, Muntner PM, Noda H, Ohkubo T, Ortiz A, Perico N, Polkinghorne K, Al-Radaddi R, Remuzzi G, Roth G, Rothenbacher D, Satoh M, Saum KU, Sawhney M, Schöttker B, Shankar A, Shlipak M, Silva DAS, Toyoshima H, Ukwaja K, Umesawa M, Vollset SE, Warnock DG, Werdecker A, Yamagishi K, Yano Y, Yonemoto N, Zaki MES, Naghavi M, Forouzanfar MH, Murray CJL, Coresh J, Vos T; Global Burden of Disease 2013 GFR Collaborators; CKD Prognosis Consortium; Global Burden of Disease Genitourinary Expert Group. Global Cardiovascular and Renal Outcomes of Reduced GFR. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Jul;28(7):2167-2179.
  32. Stevens LA, Li S, Wang C, Huang C, Becker BN, Bombback AS, Brown WW, Burrows NR, Jurkovitz CT, McFarlane SI, Norris KC, Shlipak M, Whaley-Connell AT, Chen SC, Bakris GL, McCullough PA. Prevalence of CKD and comorbid illness in elderly patients in the United States: results from the Kidney Early Evaluation Program (KEEP). *Am J Kidney Dis*. 2010 Mar;55(3 Suppl 2):S23-33.
  33. Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med*. 2014 Jul 3;371(1):58-66.
  34. Bábičková J, Klinkhammer BM, Buhl EM, Djudjaj S, Hoss M, Heymann F, Tacke F, Floege J, Becker JU, Boor P. Regardless of etiology, progressive renal disease causes ultrastructural and functional alterations of peritubular capillaries. *Kidney Int*. 2017 Jan;91(1):70-85.
  35. Zeisberg M, Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013 Feb 1;304(3):C216-25.
  36. Papazova DA, Oosterhuis NR, Gremmels H, van Koppen A, Joles JA, Verhaar MC. Cell-based therapies for experimental chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Dis Model Mech*. 2015 Mar;8(3):281-93.
  37. Hodgkins KS, Schnaper HW. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2012 Jun;27(6):901-9.

38. Leaf IA, Duffield JS. What can target kidney fibrosis? *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Jan 1;32(suppl\_1):i89-i97.
39. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2014 Sep;10(9):493-503.
40. Simon N, Hertig A. Alteration of Fatty Acid Oxidation in Tubular Epithelial Cells: From Acute Kidney Injury to Renal Fibrogenesis. *Front Med (Lausanne)*. 2015 Aug 5;2:52.
41. Wehrmann M, Bohle A, Held H, Schumm G, Kendziorra H, Pressler H. Long-term prognosis of focal sclerosing glomerulonephritis. An analysis of 250 cases with particular regard to tubulointerstitial changes. *Clin Nephrol*. 1990 Mar;33(3):115-22.
42. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. 2012 Jul 6;18(7):1028-40.
43. Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, Ortiz A, Rodrigues-Diez RR. Targeting the progression of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2020 May;16(5):269-288.
44. Kusic B, Miric D, Dragojevic I, Rasic J, Popovic L. Role of Myeloperoxidase in Patients with Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1069743.
45. Lv J, Wu Y, Mai Y, Bu S. Noncoding RNAs in Diabetic Nephropathy: Pathogenesis, Biomarkers, and Therapy. *J Diabetes Res*. 2020 Jun 19;2020:3960857.
46. Djudjaj S, Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Mol Aspects Med*. 2019 Feb;65:16-36.
47. Grande, M.T.; Sanchez-Laorden, B.; Lopez-Blau, C.; De Frutos, C.A.; Boutet, A.; Arevalo, M.; Rowe, R.G.; Weiss, S.J.; Lopez-Novoa, J.M.; Nieto, M.A. Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to re-verse established disease. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 989–997
48. Hajarnis S, Yheskel M, Williams D, Brefort T, Glaudemans B, Debaix H, Baum M, Devuyst O, Patel V. Suppression of microRNA Activity in Kidney Collecting Ducts Induces Partial Loss of Epithelial Phenotype and Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Feb;29(2):518-531.
49. Canaud G, Bonventre JV. Cell cycle arrest and the evolution of chronic kidney disease from acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2015 Apr;30(4):575-83.
50. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadnagara K, Carstens JL, Wu CC, Hagos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T, Nischal H, Allison JP, Zeisberg M, Kalluri R. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med*. 2015 Sep;21(9):998-1009.
51. Chung KW, Lee EK, Lee MK, Oh GT, Yu BP, Chung HY. Impairment of PPAR $\alpha$  and the Fatty Acid Oxidation Pathway Aggravates Renal Fibrosis during Aging. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Apr;29(4):1223-1237.
52. Liu BC, Tang TT, Lv LL, Lan HY. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2018 Mar;93(3):568-579.
53. Song Y, Lv S, Wang F, Liu X, Cheng J, Liu S, Wang X, Chen W, Guan G, Liu G, Peng C. Overexpression of BMP-7 reverses TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition by attenuating the Wnt3/ $\beta$ -catenin and TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 signaling pathways in HK-2 cells. *Mol Med Rep*. 2020 Feb;21(2):833-841.
54. Tampe B, Tampe D, Nyamsuren G, Klöpffer F, Rapp G, Kauffels A, Lorf T, Zeisberg EM, Müller GA, Kalluri R, Hakrrouch S, Zeisberg M. Pharmacological induction of hypoxia-inducible transcription factor ARNT attenuates chronic kidney failure. *J Clin Invest*. 2018 Jul 2;128(7):3053-3070.

55. Tampe B, Tampe D, Zeisberg EM, Müller GA, Bechtel-Walz W, Koziolk M, Kalluri R, Zeisberg M. Induction of Tet3-dependent Epigenetic Remodeling by Low-dose Hydralazine Attenuates Progression of Chronic Kidney Disease. *EBioMedicine*. 2015 Jan;2(1):19-36.
56. Tampe B, Steinle U, Tampe D, Carstens JL, Korsten P, Zeisberg EM, Müller GA, Kalluri R, Zeisberg M. Low-dose hydralazine prevents fibrosis in a murine model of acute kidney injury-to-chronic kidney disease progression. *Kidney Int*. 2017 Jan;91(1):157-176.
57. Larkin BP, Saad S, Glastras SJ, Nguyen LT, Hou M, Chen H, Wang R, Pollock CA. Low-dose hydralazine during gestation reduces renal fibrosis in rodent offspring exposed to maternal high fat diet. *PLoS One*. 2021 Mar 18;16(3):e0248854.
58. Zhou X, Zang X, Ponnusamy M, Masucci MV, Tolbert E, Gong R, Zhao TC, Liu N, Bayliss G, Dworkin LD, Zhuang S. Enhancer of Zeste Homolog 2 Inhibition Attenuates Renal Fibrosis by Maintaining Smad7 and Phosphatase and Tensin Homolog Expression. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Jul;27(7):2092-108.
59. Morgado-Pascual JL, Rayego-Mateos S, Tejedor L, Suarez-Alvarez B, Ruiz-Ortega M. Bromodomain and Extraterminal Proteins as Novel Epigenetic Targets for Renal Diseases. *Front Pharmacol*. 2019 Nov 8;10:1315.
60. Mello MLS. Sodium Valproate-Induced Chromatin Remodeling. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Apr 20;9:645518.
61. Briasoulis A, Bakris GL. Chronic kidney disease as a coronary artery disease risk equivalent. *Curr Cardiol Rep*. 2013 Mar;15(3):340.
62. Husain-Syed F, McCullough PA, Birk HW, Renker M, Brocca A, Seeger W, Ronco C. Cardio-Pulmonary-Renal Interactions: A Multidisciplinary Approach. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Jun 9;65(22):2433-48.
63. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Health Statistics. "Leading Causes of Death: Deaths: Final Data for 2013, Table 10." Available at: <http://www.cdc.gov/nchs/fastats/leading-causes-of-death.htm>. Accessed on: September 4, 2015.
64. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syv anne M, Scholte op Reimer WJ, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F; European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR); ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J*. 2012 Jul;33(13):1635-701.
65. Manjunath G, Tighiouart H, Ibrahim H, MacLeod B, Salem DN, Griffith JL, Coresh J, Levey AS, Sarnak MJ. Level of kidney function as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular outcomes in the community. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Jan 1;41(1):47-55
66. Menon V, Gul A, Sarnak MJ. Cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2005 Oct;68(4):1413-8.
67. Subbiah AK, Chhabra YK, Mahajan S. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease: a neglected subgroup. *Heart Asia*. 2016 Nov 7;8(2):56-61.

68. Keith DS, Nichols GA, Gullion CM, Brown JB, Smith DH. Longitudinal follow-up and outcomes among a population with chronic kidney disease in a large managed care organization. *Arch Intern Med.* 2004 Mar 22;164(6):659-63.
69. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002 Feb;39(2 Suppl 1):S1-266.
70. Archibald G, Bartlett W, Brown A, Christie B, Elliott A, Griffith K, Pound S, Rappaport I, Robertson D, Semple Y, Slane P, Whitworth C, Williams B. UK Consensus Conference on Early Chronic Kidney Disease--6 and 7 February 2007. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Sep;22(9):2455-7.
71. Culeton BF, Larson MG, Parfrey PS, Kannel WB, Levy D. Proteinuria as a risk factor for cardiovascular disease and mortality in older people: a prospective study. *Am J Med.* 2000 Jul;109(1):1-8.
72. Grimm RH Jr, Svendsen KH, Kasiske B, Keane WF, Wahi MM. Proteinuria is a risk factor for mortality over 10 years of follow-up. MRFIT Research Group. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Kidney Int Suppl.* 1997 Dec;63:S10-4.
73. Fox CS, Matsushita K, Woodward M, Bilo HJ, Chalmers J, Heerspink HJ, Lee BJ, Perkins RM, Rossing P, Sairenchi T, Tonelli M, Vassalotti JA, Yamagishi K, Coresh J, de Jong PE, Wen CP, Nelson RG; Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. *Lancet.* 2012 Nov 10;380(9854):1662-73.
74. Mahmoodi BK, Matsushita K, Woodward M, Blankestijn PJ, Cirillo M, Ohkubo T, Rossing P, Sarnak MJ, Stengel B, Yamagishi K, Yamashita K, Zhang L, Coresh J, de Jong PE, Astor BC; Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium. Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without hypertension: a meta-analysis. *Lancet.* 2012 Nov 10;380(9854):1649-61.
75. Bansal N, Katz R, Robinson-Cohen C, Odden MC, Dalrymple L, Shlipak MG, Sarnak MJ, Siscovick DS, Zelnick L, Psaty BM, Kestenbaum B, Correa A, Afkarian M, Young B, de Boer IH. Absolute Rates of Heart Failure, Coronary Heart Disease, and Stroke in Chronic Kidney Disease: An Analysis of 3 Community-Based Cohort Studies. *JAMA Cardiol.* 2017 Mar 1;2(3):314-318.
76. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004 Sep 23;351(13):1296-305.
77. Turin TC, Tonelli M, Manns BJ, Ravani P, Ahmed SB, Hemmelgarn BR. Chronic kidney disease and life expectancy. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Aug;27(8):3182-6.
78. Turin TC, Tonelli M, Manns BJ, Ahmed SB, Ravani P, James M, Hemmelgarn BR. Proteinuria and life expectancy. *Am J Kidney Dis.* 2013 Apr;61(4):646-8.
79. Manjunath G, Tighiouart H, Coresh J, Macleod B, Salem DN, Griffith JL, Levey AS, Sarnak MJ. Level of kidney function as a risk factor for cardiovascular outcomes in the elderly. *Kidney Int.* 2003 Mar;63(3):1121-9.
80. Fujii H, Kono K, Nishi S. Characteristics of coronary artery disease in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2019 Jun;23(6):725-732.
81. Hillege HL, Nitsch D, Pfeffer MA, Swedberg K, McMurray JJ, Yusuf S, Granger CB, Michelson EL, Ostergren J, Cornel JH, de Zeeuw D, Pocock S, van Veldhuisen DJ; Candesartan in Heart Failure: Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity



- (CHARM) Investigators. Renal function as a predictor of outcome in a broad spectrum of patients with heart failure. *Circulation*. 2006 Feb 7;113(5):671-8.
82. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
  83. Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*. 2010 Jan 9;375(9709):132-40.
  84. Bakris GL. Lipid disorders in uremia and dialysis. *Contrib Nephrol*. 2012;178:100-105.
  85. Trevisan R, Dodesini AR, Lepore G. Lipids and renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Apr;17(4 Suppl 2):S145-7.
  86. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int*. 2002 Nov;62(5):1524-38.
  87. Kaysen GA, Eiserich JP. The role of oxidative stress-altered lipoprotein structure and function and microinflammation on cardiovascular risk in patients with minor renal dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Mar;15(3):538-48.
  88. Jagadeswaran D, Indhumathi E, Hemamalini AJ, Sivakumar V, Soundararajan P, Jayakumar M. Inflammation and nutritional status assessment by malnutrition inflammation score and its outcome in pre-dialysis chronic kidney disease patients. *Clin Nutr*. 2019 Feb;38(1):341-347.
  89. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation*. 2007 Jul 3;116(1):85-97.
  90. Brandes RP. Endothelial dysfunction and hypertension. *Hypertension*. 2014 Nov;64(5):924-8.
  91. Stam F, van Guldener C, Becker A, Dekker JM, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD. Endothelial dysfunction contributes to renal function-associated cardiovascular mortality in a population with mild renal insufficiency: the Hoorn study. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Feb;17(2):537-45.
  92. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, Matsushita K, Wen CP. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*. 2013 Jul 27;382(9889):339-52.
  93. Wever R, Boer P, Hijmering M, Stroes E, Verhaar M, Kastelein J, Versluis K, Lagerwerf F, van Rijn H, Koomans H, Rabelink T. Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999 May;19(5):1168-72.
  94. Desir GV, Wang L, Peixoto AJ. Human renalase: a review of its biology, function, and implications for hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 2012 Nov-Dec;6(6):417-26.
  95. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*. 1992 Mar 7;339(8793):572-5.
  96. Zoccali C, Mallamaci F, Maas R, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino LS, Cataliotti A, Bellanuova I, Böger R; CREED Investigators. Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2002 Jul;62(1):339-45.
  97. Zoccali C, Bode-Böger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frölich J, Böger R. Plasma concentration of asymmetrical



- dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*. 2001 Dec 22-29;358(9299):2113-7.
98. Ureña-Torres P, D'Marco L, Raggi P, García-Moll X, Brandenburg V, Mazzaferro S, Lieber A, Guirado L, Bover J. Valvular heart disease and calcification in CKD: more common than appreciated. *Nephrol Dial Transplant*. 2020 Dec 4;35(12):2046-2053.
  99. Rodin R, Chan CT. Determinants and Prevention of Coronary Disease in Patients With Chronic Kidney Disease. *Can J Cardiol*. 2019 Sep;35(9):1181-1187.
  100. Kooman JP, Kotanko P, Schols AM, Shiels PG, Stenvinkel P. Chronic kidney disease and premature ageing. *Nat Rev Nephrol*. 2014 Dec;10(12):732-42.
  101. Vervloet M, Cozzolino M. Vascular calcification in chronic kidney disease: different bricks in the wall? *Kidney Int*. 2017 Apr;91(4):808-817.
  102. Roufosse C, Simmonds N, Clahsen-van Groningen M, Haas M, Henriksen KJ, Horsfield C, Loupy A, Mengel M, Perkowska-Ptasińska A, Rabant M, Racusen LC, Solez K, Becker JU. A 2018 Reference Guide to the Banff Classification of Renal Allograft Pathology. *Transplantation*. 2018 Nov;102(11):1795-1814.
  103. Saran R, Robinson B, Abbott KC, Bragg-Gresham J, Chen X, Gipson D, Gu H, Hirth RA, Hutton D, Jin Y, Kapke A, Kurtz V, Li Y, McCullough K, Modi Z, Morgenstern H, Mukhopadhyay P, Pearson J, Pisoni R, Repeck K, Schaubel DE, Shamraj R, Steffick D, Turf M, Woodside KJ, Xiang J, Yin M, Zhang X, Shahinian V. US Renal Data System 2019 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2020 Jan;75(1 Suppl 1):A6-A7.
  104. Benjamin O, Lappin SL. End-Stage Renal Disease. 2021 Sep 16. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.  
Faria M, de Pinho MN. Challenges of reducing protein-bound uremic toxin levels in chronic kidney disease and end stage renal disease. *Transl Res*. 2021 Mar;229:115-134.
  105. Girndt M, Fiedler R, Martus P, Pawlak M, Storr M, Bohler T, Glomb MA, Liehr K, Henning C, Templin M, Trojanowicz B, Ulrich C, Werner K, Zickler D, Schindler R. High cut-off dialysis in chronic haemodialysis patients. *Eur J Clin Invest*. 2015 Dec;45(12):1333-40.
  106. Lai S, Bagordo D, Perrotta AM, Gigante A, Gasperini ML, Muscaritoli M, Mazzaferro S, Cianci R. Autonomic dysfunction in kidney diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Aug;24(16):8458-8468.
  107. Ammirati AL. Chronic Kidney Disease. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2020 Jan 13;66Suppl 1(Suppl 1):s03-s09.
  108. Politano SA, Colbert GB, Hamiduzzaman N. Nephrotic Syndrome. *Prim Care*. 2020 Dec;47(4):597-613.
  109. Whitney DG, Schmidt M, Bell S, Morgenstern H, Hirth RA. Incidence Rate of Advanced Chronic Kidney Disease Among Privately Insured Adults with Neurodevelopmental Disabilities. *Clin Epidemiol*. 2020 Feb 27;12:235-243.
  110. Zemaitis MR, Foris LA, Katta S, Bashir K. Uremia. 2022 Jul 18. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
  111. Murdeshwar HN, Anjum F. Hemodialysis. 2022 Jun 19. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-.
  112. Panocchia N, Tazza L, Di Stasio E, Liberatori M, Vulpio C, Giungi S, Lucani G, Antocicco M, Bossola M. Mortality in hospitalized chronic kidney disease patients starting unplanned urgent haemodialysis. *Nephrology (Carlton)*. 2016 Jan;21(1):62-7.

113. Pazos F. Range of adiposity and cardiorenal syndrome. *World J Diabetes*. 2020 Aug 15;11(8):322-350.
114. Daehn IS. Glomerular Endothelial Cell Stress and Cross-Talk With Podocytes in Early [corrected] Diabetic Kidney Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Mar 23;5:76. doi: 10.3389/fmed.2018.00076. Erratum in: *Front Med (Lausanne)*. 2018 Apr 26;5:113.
115. Finnigan NA, Leslie SW. Polycystic Kidney Disease In Adults. 2022 May 27. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan—.
116. Gasparotto M, Gatto M, Binda V, Doria A, Moroni G. Lupus nephritis: clinical presentations and outcomes in the 21st century. *Rheumatology (Oxford)*. 2020 Dec 5;59(Suppl5):v39-v51.
117. Ademola BL, Atanda AT, Aji SA, Abdu A. Clinical, morphologic and histological features of chronic pyelonephritis: An 8-year review. *Niger Postgrad Med J*. 2020 Jan-Mar;27(1):37-41.
118. Devuyt O, Olinger E, Weber S, Eckardt KU, Kmoch S, Rampoldi L, Bleyer AJ. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Sep 5;5(1):60.
119. Padmanabhan A, Gohil S, Gadgil NM, Sachdeva P. Chronic renal failure: An autopsy study. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2017 May-Jun;28(3):545-551.
120. Apel M, Maia VP, Zeidan M, Schinkoethe C, Wolf G, Reinhart K, Sakr Y. End-stage renal disease and outcome in a surgical intensive care unit. *Crit Care*. 2013 Dec 23;17(6):R298.
121. Tuegel C, Katz R, Alam M, Bhat Z, Bellovich K, de Boer I, Brosius F, Gadegbeku C, Gipson D, Hawkins J, Himmelfarb J, Ju W, Kestenbaum B, Kretzler M, Robinson-Cohen C, Steigerwalt S, Bansal N. GDF-15, Galectin 3, Soluble ST2, and Risk of Mortality and Cardiovascular Events in CKD. *Am J Kidney Dis*. 2018 Oct;72(4):519-528.
122. Onuigbo MAC. End-Stage Renal Disease Risk in Different Glomerulonephropathies. *Mayo Clin Proc*. 2018 Jul;93(7):958-959.
123. Sim JJ, Bhandari SK, Batech M, Hever A, Harrison TN, Shu YH, Kujubu DA, Jonelis TY, Kanter MH, Jacobsen SJ. End-Stage Renal Disease and Mortality Outcomes Across Different Glomerulonephropathies in a Large Diverse US Population. *Mayo Clin Proc*. 2018 Feb;93(2):167-178.
124. Yang Y, Zhang Z, Zhuo L, Chen DP, Li WG. The Spectrum of Biopsy-Proven Glomerular Disease in China: A Systematic Review. *Chin Med J (Engl)*. 2018 Mar 20;131(6):731-735.
125. Lin J, Jiang Z, Liu C, Zhou D, Song J, Liao Y, Chen J. Emerging Roles of Long Non-Coding RNAs in Renal Fibrosis. *Life (Basel)*. 2020 Aug 1;10(8):131.
126. Miesen L, Eymael J, Sharma S, Loeven MA, Willemsen B, Bakker-van Bebbber M, Mooren F, Meyer-Schwesinger C, Dijkman H, Wetzels JFM, Jansen J, van der Vlag J, Smeets B. Inhibition of mTOR delayed but could not prevent experimental collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *Sci Rep*. 2020 May 22;10(1):8580.
127. Hesp AC, Schaub JA, Prasad PV, Vallon V, Laverman GD, Bjornstad P, van Raalte DH. The role of renal hypoxia in the pathogenesis of diabetic kidney disease: a promising target for newer renoprotective agents including SGLT2 inhibitors? *Kidney Int*. 2020 Sep;98(3):579-589.

128. Hamza E, Metzinger L, Metzinger-Le Meuth V. Uremic Toxins Affect Erythropoiesis during the Course of Chronic Kidney Disease: A Review. *Cells*. 2020 Sep 6;9(9):2039.
129. Masuda T, Nagata D. Recent advances in the management of secondary hypertension: chronic kidney disease. *Hypertens Res*. 2020 Sep;43(9):869-875.
130. Saritas T, Floege J. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Herz*. 2020 Apr;45(2):122-128. English.
131. Coronado Daza J, Martí-Carvajal AJ, Ariza García A, Rodelo Ceballos J, Yomayusa González N, Páez-Canro C, Loza Munárriz C, Urrútia G. Early versus delayed erythropoietin for the anaemia of end-stage kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Dec 16;2015(12):CD011122.
132. Weiss G, Ganz T, Goodnough LT. Anemia of inflammation. *Blood*. 2019 Jan 3;133(1):40
133. Cohen G. Immune Dysfunction in Uremia 2020. *Toxins (Basel)*. 2020 Jul 5;12(7):439.
134. Betjes MG. Uremia-Associated Ageing of the Thymus and Adaptive Immune Responses. *Toxins (Basel)*. 2020 Apr 3;12(4):224.
135. Chiu YL, Tsai WC, Hung RW, Chen IY, Shu KH, Pan SY, Yang FJ, Ting TT, Jiang JY, Peng YS, Chuang YF. Emergence of T cell immunosenescence in diabetic chronic kidney disease. *Immun Ageing*. 2020 Oct 20;17:31.
136. Ebert T, Pawelzik SC, Witasz A, Arefin S, Hobson S, Kublickiene K, Shiels PG, Bäck M, Stenvinkel P. Inflammation and Premature Ageing in Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel)*. 2020 Apr 4;12(4):227.
137. Querfeld U, Mak RH, Pries AR. Microvascular disease in chronic kidney disease: the base of the iceberg in cardiovascular comorbidity. *Clin Sci (Lond)*. 2020 Jun 26;134(12):1333-1356.
138. Eroglu E, Kocyigit I, Lindholm B. The endothelin system as target for therapeutic interventions in cardiovascular and renal disease. *Clin Chim Acta*. 2020 Jul;506:92-106.
139. Jung J, Bae GH, Kang M, Kim SW, Lee DH. Statins and All-Cause Mortality in Patients Undergoing Hemodialysis. *J Am Heart Assoc*. 2020 Mar 3;9(5):e014840.
140. Deferrari G, Cipriani A, La Porta E. Renal dysfunction in cardiovascular diseases and its consequences. *J Nephrol*. 2021 Feb;34(1):137-153.
141. Joseph MS, Palardy M, Bhavne NM. Management of heart failure in patients with end-stage kidney disease on maintenance dialysis: a practical guide. *Rev Cardiovasc Med*. 2020 Mar 30;21(1):31-39.
142. Raina R, Nair N, Chakraborty R, Nemer L, Dasgupta R, Varian K. An Update on the Pathophysiology and Treatment of Cardiorenal Syndrome. *Cardiol Res*. 2020 Apr;11(2):76-88.
143. Triposkiadis F, Starling RC, Boudoulas H, Giamouzis G, Butler J. The cardiorenal syndrome in heart failure: cardiac? renal? syndrome? *Heart Fail Rev*. 2012 May;17(3):355-66.
144. Sharma A, Sharma A, Gahlot S, Prasher PK. A study of pulmonary function in end-stage renal disease patients on hemodialysis: a cross-sectional study. *Sao Paulo Med J*. 2017 Nov-Dec;135(6):568-572.
145. Zhang LJ, Wen J, Ni L, Zhong J, Liang X, Zheng G, Lu GM. Predominant gray matter volume loss in patients with end-stage renal disease: a voxel-based morphometry study. *Metab Brain Dis*. 2013 Dec;28(4):647-54.

146. Chiu YL, Tsai HH, Lai YJ, Tseng HY, Wu YW, Peng YS, Chiu CM, Chuang YF. Cognitive impairment in patients with end-stage renal disease: Accelerated brain aging? *J Formos Med Assoc.* 2019 May;118(5):867-875.
147. Mindikoglu AL, Pappas SC. New Developments in Hepatorenal Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018 Feb;16(2):162-177.e1. doi: 10.1016/j.cgh.2017.05.041. Epub 2017 Jun 7. Erratum in: *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018 Jun;16(6):988.
148. Simonetto DA, Gines P, Kamath PS. Hepatorenal syndrome: pathophysiology, diagnosis, and management. *BMJ.* 2020 Sep 14;370:m2687.
149. Francoz C, Durand F, Kahn JA, Genyk YS, Nadim MK. Hepatorenal Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2019 May 7;14(5):774-781.
150. Zhou ZF, Jiang L, Zhao Q, Wang Y, Zhou J, Chen QK, Lv JL. Roles of pattern recognition receptors in diabetic nephropathy. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2020 Mar.;21(3):192-203.
151. Gusev EY, Zotova NV. Cellular Stress and General Pathological Processes. *Curr Pharm Des.* 2019;25(3):251-297.
152. Kielstein JT, Pontremoli R, Burnier M. Management of Hyperuricemia in Patients with Chronic Kidney Disease: a Focus on Renal Protection. *Curr Hypertens Rep.* 2020 Oct 31;22(12):102.
153. Sabatino A, Regolisti G, Cosola C, Gesualdo L, Fiaccadori E. Intestinal Microbiota in Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Curr Diab Rep.* 2017 Mar;17(3):16.
154. Terpstra ML, Sinnige MJ, Hugenholtz F, Peters-Sengers H, Remmerswaal EB, Geerlings SE, Bemelman FJ. Butyrate production in patients with end-stage renal disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2019 May 6;12:87-101.
155. Zhang L, Zhang W, Nie J. Gut Microbiota and Renal Injury. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1238:93-106.
156. Kumar Pasupulati A, Chitra PS, Reddy GB. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. *Biomol Concepts.* 2016 Dec 1;7(5-6):293-309.
157. Yang X, Okamura DM, Lu X, Chen Y, Moorhead J, Varghese Z, Ruan XZ. CD36 in chronic kidney disease: novel insights and therapeutic opportunities. *Nat Rev Nephrol.* 2017 Dec;13(12):769-781.
158. Gusev, E.Y.; Zotova, N.V.; Zhuravleva, Y.A.; Chereshev, V.A. Physiological and pathogenic role of scavenger receptors in humans. *Med. Immunol.* **2020**, *22*, 7–48.
159. Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KA, Zoungas S, Rossing P, Groop PH, Cooper ME. Diabetic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2015 Jul 30;1:15018.
160. Chen Y, Qiao F, Zhao Y, Wang Y, Liu G. HMGB1 is activated in type 2 diabetes mellitus patients and in mesangial cells in response to high glucose. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Jun 1;8(6):6683-91.
161. ojs R, Ekart R, Bevc S, Hojs N. Biomarkers of Renal Disease and Progression in Patients with Diabetes. *J Clin Med.* 2015 May 19;4(5):1010-24.
162. Fraenkel PG. Understanding anemia of chronic disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2015;2015:14-8.

163. Alnaggar ARLR, Sayed M, El-Deena KE, Gomaa M, Hamed Y. Evaluation of serum adiponectin levels in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Syndr.* 2019 Jan-Feb;13(1):128-131.
164. Marouga A, Dalamaga M, Kastania AN, Kroupis C, Lagiou M, Saounatsou K, Dimas K, Vlahakos DV. Circulating resistin is a significant predictor of mortality independently from cardiovascular comorbidities in elderly, non-diabetic subjects with chronic kidney disease. *Biomarkers.* 2016;21(1):73-9.
165. Tong X, Yu Q, Ankawi G, Pang B, Yang B, Yang H. Insights into the Role of Renal Biopsy in Patients with T2DM: A Literature Review of Global Renal Biopsy Results. *Diabetes Ther.* 2020 Sep;11(9):1983-1999.
166. Tesch GH. Diabetic nephropathy - is this an immune disorder? *Clin Sci (Lond).* 2017 Jul 31;131(16):2183-2199.
167. Buraczynska M, Swatowski A, Buraczynska K, Dragan M, Ksiazek A. Heat-shock protein gene polymorphisms and the risk of nephropathy in patients with Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2009 Jan;116(1):81-6.
168. Yamanouchi M, Mori M, Hoshino J, Kinowaki K, Fujii T, Ohashi K, Furuichi K, Wada T, Ubara Y. Retinopathy progression and the risk of end-stage kidney disease: results from a longitudinal Japanese cohort of 232 patients with type 2 diabetes and biopsy-proven diabetic kidney disease. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2019 Nov 2;7(1):e000726.
169. Wu WY, Zhou XJ, Sun PP, Yu XJ, Wang SX, Qu L, Zhang F, Ma YY, Lv JC, Liu G, Yang L. Interstitial eosinophilic infiltration in diabetic nephropathy is indicative of poor prognosis, with no therapy benefit from steroid. *J Diabetes.* 2020 Dec;12(12):881-894.
170. Zeng LF, Xiao Y, Sun L. A Glimpse of the Mechanisms Related to Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1165:49-79.
171. ang X, Mou S. Role of Immune Cells in Diabetic Kidney Disease. *Curr Gene Ther.* 2017;17(6):424-433.
172. Fan J, Xie K, Wang L, Zheng N, Yu X. Roles of Inflammasomes in Inflammatory Kidney Diseases. *Mediators Inflamm.* 2019 Jul 21;2019:2923072.
173. Duni A, Liakopoulos V, Roumeliotis S, Peschos D, Dounousi E. Oxidative Stress in the Pathogenesis and Evolution of Chronic Kidney Disease: Untangling Ariadne's Thread. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 29;20(15):3711
174. Chang MS, Hsu YH. The role of IL-20 in chronic kidney disease and diabetic nephropathy: Pathogenic and therapeutic implications. *J Leukoc Biol.* 2018 Nov;104(5):919-923.
175. Corden B, Adami E, Sweeney M, Schafer S, Cook SA. IL-11 in cardiac and renal fibrosis: Late to the party but a central player. *Br J Pharmacol.* 2020 Apr;177(8):1695-1708.
176. Klimczak-Tomaniak D, Pilecki T, Żochowska D, Sieńko D, Janiszewski M, Pączek L, Kuch M. CXCL12 in Patients with Chronic Kidney Disease and Healthy Controls: Relationships to Ambulatory 24-Hour Blood Pressure and Echocardiographic Measures. *Cardiorenal Med.* 2018;8(3):249-258.
177. Liu M, Ning X, Li R, Yang Z, Yang X, Sun S, Qian Q. Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis. *J Cell Mol Med.* 2017 Jul;21(7):1248-1259.
178. Prakoura N, Hadchouel J, Chatziantoniou C. Novel Targets for Therapy of Renal Fibrosis. *J Histochem Cytochem.* 2019 Sep;67(9):701-715.

179. Isakova T. Fibroblast growth factor 23 and adverse clinical outcomes in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012 May;21(3):334-40.
180. Mirza MA, Larsson A, Melhus H, Lind L, Larsson TE. Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population. *Atherosclerosis*. 2009 Dec;207(2):546-51.
181. Solari V, Unemoto K, Piaseczna Piotrowska A, Puri P. Increased expression of mast cells in reflux nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2004 Feb;19(2):157-63.
182. Tóth T, Tóth-Jakatics R, Jimi S, Takebayashi S. Increased density of interstitial mast cells in amyloid A renal amyloidosis. *Mod Pathol*. 2000 Sep;13(9):1020-8.
183. Karihaloo A. Role of Inflammation in Polycystic Kidney Disease. In: Li X, editor. *Polycystic Kidney Disease* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2015 Nov. Chapter 14.
184. Ruan X, Guan Y. Metabolic syndrome and chronic kidney disease. *J Diabetes*. 2009 Dec;1(4):236-45.
185. Dai L, Golembiewska E, Lindholm B, Stenvinkel P. End-Stage Renal Disease, Inflammation and Cardiovascular Outcomes. *Contrib Nephrol*. 2017;191:32-43.
186. Canaud B, Kooman JP, Selby NM, Taal MW, Francis S, Maierhofer A, Kopperschmidt P, Collins A, Kotanko P. Dialysis-Induced Cardiovascular and Multiorgan Morbidity. *Kidney Int Rep*. 2020 Sep 9;5(11):1856-1869.
187. Ahmadmehrabi S, Tang WHW. Hemodialysis-induced cardiovascular disease. *Semin Dial*. 2018 May;31(3):258-267.
188. Kohlová M, Amorim CG, Araújo A, Santos-Silva A, Solich P, Montenegro MCBSM. The biocompatibility and bioactivity of hemodialysis membranes: their impact in end-stage renal disease. *J Artif Organs*. 2019 Mar;22(1):14-28.
189. Martinez Cantarin MP, Whitaker-Menezes D, Lin Z, Falkner B. Uremia induces adipose tissue inflammation and muscle mitochondrial dysfunction. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 Jun 1;32(6):943-951.
190. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*, 9th ed.; Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2018; 608p.
191. Yamaguchi T, Takizawa F, Fischer U, Dijkstra JM. Along the Axis between Type 1 and Type 2 Immunity; Principles Conserved in Evolution from Fish to Mammals. *Biology (Basel)*. 2015 Nov 17;4(4):814-59
192. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010 Feb 5;327(5966):656-61.
193. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014 Jul 17;41(1):14-20.
194. Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol*. 2016 Apr;28(4):163-71.
195. Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, Weaver CT. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity*. 2009 Jan 16;30(1):92-107.
196. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:925135.

197. Wang Y, Souabni A, Flavell RA, Wan YY. An intrinsic mechanism predisposes Foxp3-expressing regulatory T cells to Th2 conversion in vivo. *J Immunol.* 2010 Nov 15;185(10):5983-92.
198. Senthilkumar GP, Anithalekshmi MS, Yasir M, Parameswaran S, Packirisamy RM, Bobby Z. Role of omentin 1 and IL-6 in type 2 diabetes mellitus patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Syndr.* 2018 Jan-Mar;12(1):23-26.
199. Zotova NV, Chereshev VA, Gusev EY. Systemic Inflammation: Methodological Approaches to Identification of the Common Pathological Process. *PLoS One.* 2016 May 6;11(5):e0155138.
200. Zotova NV, Zhuravleva YV, Zubova TE, Gusev EY. Integral estimation of systemic inflammatory response under sepsis. *Gen Physiol Biophys.* 2020 Jan;39(1):13-26.
201. Batko K, Krzanowski M, Gajda M, Dumnicka P, Fedak D, Woziwodzka K, Sułowicz W, Kuźniewski M, Litwin JA, Krzanowska K. Endothelial injury is closely related to osteopontin and TNF receptor-mediated inflammation in end-stage renal disease. *Cytokine.* 2019 Sep;121:154729.
202. Bi X, Chu M, Ai H, Hu C, Ding W. Association of serum IL-18 with protein-energy wasting in end-stage renal disease patients on haemodialysis. *Int Urol Nephrol.* 2019 Jul;51(7):1271-1278
203. Gohda T, Maruyama S, Kamei N, Yamaguchi S, Shibata T, Murakoshi M, Horikoshi S, Tomino Y, Ohsawa I, Gotoh H, Nojiri S, Suzuki Y. Circulating TNF Receptors 1 and 2 Predict Mortality in Patients with End-stage Renal Disease Undergoing Dialysis. *Sci Rep.* 2017 Mar 3;7:43520.
204. 180. Hartzell, S.; Bin, S.; Cantarelli, C.; Haverly, M.; Manrique, J.; Angeletti, A.; Manna, G.L.; Murphy, B.; Zhang, W.; Levitsky, J.; et al. Kidney Failure Associates with T Cell Exhaustion and Imbalanced Follicular Helper T Cells. *Front. Immunol.* **2020**, 11, 583702.[[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Hojs R, Ekart R, Bevc S, Hojs N. Markers of Inflammation and Oxidative Stress in the Development and Progression of Renal Disease in Diabetic Patients. *Nephron.* 2016;133(3):159-62.
206. Mak RH, Cheung W, Cone RD, Marks DL. Mechanisms of disease: Cytokine and adipokine signaling in uremic cachexia. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006 Sep;2(9):527-34.
207. Oncel M, Akbulut S, Toka Ozer T, Kiyici A, Keles M, Baltaci B, Turk S. Cytokines, adipocytokines and inflammatory markers in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis. *Ren Fail.* 2016 Aug;38(7):1071-5.
208. Rusu CC, Racasan S, Kacso IM, Ghervan L, Moldovan D, Potra A, Patiu IM, Bondor C, Caprioara MG. The association of high sCD163/sTWEAK ratio with cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol.* 2015 Dec;47(12):2023-30.
209. Tao R, Fan Q, Zhang H, Xie H, Lu L, Gu G, Wang F, Xi R, Hu J, Chen Q, Niu W, Shen W, Zhang R, Yan X. Prognostic Significance of Interleukin-34 (IL-34) in Patients With Chronic Heart Failure With or Without Renal Insufficiency. *J Am Heart Assoc.* 2017 Apr 1;6(4):e004911.
210. Elevated Plasma Cyclophillin A in Hemodialysis and Peritoneal Dialysis Patients: A Novel Link to Systemic Inflammation

211. Bessa J, Albino-Teixeira A, Reina-Couto M, Sousa T. Endocan: A novel biomarker for risk stratification, prognosis and therapeutic monitoring in human cardiovascular and renal diseases. *Clin Chim Acta*. 2020 Oct;509:310-335.
212. Desjardins MP, Thorin-Trescases N, Sidibé A, Fortier C, De Serres SA, Larivière R, Thorin E, Agharazii M. Levels of Angiopoietin-Like-2 Are Positively Associated With Aortic Stiffness and Mortality After Kidney Transplantation. *Am J Hypertens*. 2017 Apr 1;30(4):409-416.
213. Erturk I, Yesildal F, Acar R, Ozgurtas T, Saglam K. Vascular endothelial growth factor and soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in patients with end-stage renal disease. Associations with laboratory findings, comorbidities, and medications. *Saudi Med J*. 2018 Jun;39(6):586-591.
214. Gusev, E.Y.; Solomatina, L.V.; Zhuravleva, Y.A.; Zubova, T.E. Systemic Inflammatory Reaction in ESRD Patients. *Nephrol. Dial.* **2008**, 10, 248–253.
215. Gusev, E.Y.; Solomatina, L.V.; Panshina, E.V.; Zhiravleva, J.A.; Zubova, T.E. Systemic Inflammation in Chronic Renal Allograft Dysfunction. *Nephrol. Dialysis* **2011**, 13, 82–88.
216. Gusev, E.Y.; Solomatina, L.V.; Zhuravleva, J.A.; Zubova, T.E. Comparative Analysis of Markers of Systemic Inflammatory Reaction in End-Stage Renal Disease (ESRD) Patients. *Nephrol. Dial.* **2009**, 11, 123–128.
217. Solomatina, L.V. The Role of Chronic Systemic Inflammation in the Pathogenesis of End-Stage Renal Failure in Patients Receiving Programmed Hemodialysis Replacement Therapy. Ph.D. Thesis, Institute of Immunology and Physiology of Ural Branch of the Russian Academy of Science, Ekaterinburg, Russia, 30 March 2012. (In Russian).
218. Li XQ, Lerman LO, Meng Y. Potential role of extracellular vesicles in the pathophysiology of glomerular diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2020 Oct 30;134(20):2741-2754.
219. Zhang W, Zhou X, Zhang H, Yao Q, Liu Y, Dong Z. Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016 Nov 1;311(5):F844-F851.
220. Lutz J, Menke J, Sollinger D, Schinzel H, Thürmel K. Haemostasis in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Jan;29(1):29-40.
221. Haller C, Zehelein J, Remppis A, Müller-Bardorff M, Katus HA. Cardiac troponin T in patients with end-stage renal disease: absence of expression in truncal skeletal muscle. *Clin Chem*. 1998 May;44(5):930-8.
222. Contreras AM, Ruiz I, Polanco-Cruz G, Monteón FJ, Celis A, Vázquez G, Gómez-Herrera E, García-Correa JE, Male-Velázquez R, Ruelas-Hernández S. End-stage renal disease and hepatitis C infection: comparison of alanine aminotransferase levels and liver histology in patients with and without renal damage. *Ann Hepatol*. 2007 Jan-Mar;6(1):48-54.
223. Graul AI, Stringer M, Sorbera L. Cachexia. *Drugs Today (Barc)*. 2016 Sep;52(9):519-529.
224. Sabatino A, Cuppari L, Stenvinkel P, Lindholm B, Avesani CM. Sarcopenia in chronic kidney disease: what have we learned so far? *J Nephrol*. 2021 Aug;34(4):1347-1372.
225. Arimura T, Shiba T, Takahashi M, Kumashiro S, Osamura H, Matsumoto T, Sakai K, Hori Y. Assessment of ocular microcirculation in patients with end-stage kidney disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2018 Dec;256(12):2335-2340.



226. Nelson AJ, Dundon BK, Worthley SG, Richardson JD, Puri R, Wong DTL, Coates PT, Faull RJ, Worthley MI. End-stage renal failure is associated with impaired coronary microvascular function. *Coron Artery Dis.* 2019 Nov;30(7):520-527.
227. Smogorzewski MJ. Skin Blood Flow and Vascular Endothelium Function in Uremia. *J Ren Nutr.* 2017 Nov;27(6):465-469.
228. Houben AJHM, Martens RJH, Stehouwer CDA. Assessing Microvascular Function in Humans from a Chronic Disease Perspective. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Dec;28(12):3461-3472.
229. Meinders AJ, Nieuwenhuis L, Ince C, Bos WJ, Elbers PW. Haemodialysis Impairs the Human Microcirculation Independent from Macrohemodynamic Parameters. *Blood Purif.* 2015;40(1):38-44.
230. Yeh YC, Chao A, Lee CY, Lee CT, Yeh CC, Liu CM, Tsai MK. An observational study of microcirculation in dialysis patients and kidney transplant recipients. *Eur J Clin Invest.* 2017 Sep;47(9):630-637.
231. Popova JA, Yadrihinskaya VN, Krylova MI, Sleptsova SS, Borisova NV. Comparison of clinical and laboratory parameters in patients with end-stage renal failure in the outcome of chronic glomerulonephritis and patients with end-stage renal failure in the outcome of other diseases. *Wiad Lek.* 2016;69(6):739-741. .
232. Rios DR, Carvalho Md, Lwaleed BA, Simões e Silva AC, Borges KB, Dusse LM. Hemostatic changes in patients with end stage renal disease undergoing hemodialysis. *Clin Chim Acta.* 2010 Feb;411(3-4):135-9.
233. Jalal DI, Chonchol M, Targher G. Disorders of hemostasis associated with chronic kidney disease. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Feb;36(1):34-40.
234. Hakim RM. Clinical sequelae of complement activation in hemodialysis. *Clin Nephrol.* 1986;26 Suppl 1:S9-12.
235. Kubatiev A, Rudko I, Ermolenko V. Complement activation and neutrophil aggregation changes during haemodialysis. *Int J Clin Pharmacol Res.* 1993;13(6):293-9.
236. Robertson LM, Frith JA, Tcheurekdjian H, Hostoffer RW. Possible mast cell activation syndrome in a patient undergoing long-term hemodialysis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016 Jun;116(6):576-7.
237. Narita I, Iguchi S, Omori K, Gejyo F. Uremic pruritus in chronic hemodialysis patients. *J Nephrol.* 2008 Mar-Apr;21(2):161-5.
238. Leong SO, Tan CC, Lye WC, Lee EJ, Chan HL. Dermal mast cell density and pruritus in end-stage renal failure. *Ann Acad Med Singap.* 1994 May;23(3):327-9.
239. Oweis AO, Al-Qarqaz F, Bodoor K, Heis L, Alfaqih MA, Almomani R, Obeidat MA, Alshelleh SA. Elevated interleukin 31 serum levels in hemodialysis patients are associated with uremic pruritus. *Cytokine.* 2021 Feb;138:155369.
240. Ellis HA, Peart KM, Pierides AM. Effect of renal transplantation on marrow mast cell hyperplasia of chronic renal failure. *J Clin Pathol.* 1977 Oct;30(10):960-5.
241. Dugas-Breit S, Schöpf P, Dugas M, Schiffli H, Ruëff F, Przybilla B. Baseline serum levels of mast cell tryptase are raised in hemodialysis patients and associated with severity of pruritus. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2005 May;3(5):343-7.
242. Wasse H, Rivera AA, Huang R, Martinson DE, Long Q, McKinnon W, Naqvi N, Husain A. Increased plasma chymase concentration and mast cell chymase expression in venous neointimal lesions of patients with CKD and ESRD. *Semin Dial.* 2011 Nov-Dec;24(6):688-93.

243. Zhang L, Wu JH, Otto JC, Gurley SB, Hauser ER, Shenoy SK, Nagi K, Brian L, Wertman V, Mattocks N, Lawson JH, Freedman NJ. Interleukin-9 mediates chronic kidney disease-dependent vein graft disease: a role for mast cells. *Cardiovasc Res.* 2017 Nov 1;113(13):1551-1559.
244. Ekdahl KN, Soveri I, Hilborn J, Fellström B, Nilsson B. Cardiovascular disease in haemodialysis: role of the intravascular innate immune system. *Nat Rev Nephrol.* 2017 May;13(5):285-296.
245. Laudański K, Nowak Z. Aberrant function and differentiation of monocytes in end stage renal disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012 Dec;60(6):453-9.
246. Bronze-da-Rocha E, Santos-Silva A. Neutrophil Elastase Inhibitors and Chronic Kidney Disease. *Int J Biol Sci.* 2018 Jul 27;14(10):1343-1360.
247. Kim JK, Lee HW, Joo N, Lee HS, Song YR, Kim HJ, Kim SG. Prognostic role of circulating neutrophil extracellular traps levels for long-term mortality in new end-stage renal disease patients. *Clin Immunol.* 2020 Jan;210:108263.
248. Fukushi T, Yamamoto T, Yoshida M, Fujikura E, Miyazaki M, Nakayama M. Enhanced neutrophil apoptosis accompanying myeloperoxidase release during hemodialysis. *Sci Rep.* 2020 Dec 10;10(1):21747
249. Kim JK, Hong CW, Park MJ, Song YR, Kim HJ, Kim SG. Increased Neutrophil Extracellular Trap Formation in Uremia Is Associated with Chronic Inflammation and Prevalent Coronary Artery Disease. *J Immunol Res.* 2017;2017:8415179.
250. Hällgren R, Grefberg N, Venge P. Elevated circulating levels of eosinophil cationic protein in uremia as signs of abnormal eosinophil homeostasis. *Nephron.* 1984;36(1):10-4.
251. Ferraris JR, Ramirez JA, Goldberg V, Rivarola MA. Glucocorticoids and adrenal androgens in children with end stage renal disease. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1991 Mar;124(3):245-50.
252. Raff H, Trivedi H. Circadian rhythm of salivary cortisol, plasma cortisol, and plasma ACTH in end-stage renal disease. *Endocr Connect.* 2012 Nov 19;2(1):23-31.
253. Arregger AL, Cardoso EM, Zucchini A, Aguirre EC, Elbert A, Contreras LN. Adrenocortical function in hypotensive patients with end stage renal disease. *Steroids.* 2014 Jun;84:57-63.
254. Kocyigit I, Unal A, Tanriverdi F, Hayri Sipahioğlu M, Tokgoz B, Oymak O, Utas C. Misdiagnosis of Addison's disease in a patient with end-stage renal disease. *Ren Fail.* 2011;33(1):88-91.
255. Lakhtin M, Lakhtin V, Alyoshkin V, Afanasyev S. Lectins of beneficial microbes: system organisation, functioning and functional superfamily. *Benef Microbes.* 2011 Jun;2(2):155-65.
256. De Schutter K, Van Damme EJ. Protein-carbohydrate interactions as part of plant defense and animal immunity. *Molecules.* 2015 May 19;20(5):9029-53.
257. Feizi TE, Haltiwanger RS. Editorial overview: Carbohydrate-protein interactions and glycosylation: Glycan synthesis and recognition: finding the perfect partner in a sugar-coated life. *Curr Opin Struct Biol.* 2015 Oct;34:vii-ix.
258. Fortuna-Costa A, Gomes AM, Kozłowski EO, Stelling MP, Pavão MS. Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Front Oncol.* 2014 Jun 16;4:138.
259. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Jan;1183:158-82.

260. Di Lella S, Sundblad V, Cerliani JP, Guardia CM, Estrin DA, Vasta GR, Rabinovich GA. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry*. 2011 Sep 20;50(37):7842-57.
261. Thiemann S, Baum LG. Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu Rev Immunol*. 2016 May 20;34:243-64
262. Arthur CM, Baruffi MD, Cummings RD, Stowell SR. Evolving mechanistic insights into galectin functions. *Methods Mol Biol*. 2015;1207:1-35.
263. Ho MK, Springer TA. Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol*. 1982 Mar;128(3):1221-8.
264. Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J Biol Chem*. 1992 Jul 15;267(20):14167-74.
265. Massa SM, Cooper DN, Leffler H, Barondes SH. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry*. 1993 Jan 12;32(1):260-7.
266. Sato S, Hughes RC. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J Biol Chem*. 1992 Apr 5;267(10):6983-90.
267. Sparrow CP, Leffler H, Barondes SH. Multiple soluble beta-galactoside-binding lectins from human lung. *J Biol Chem*. 1987 May 25;262(15):7383-90.
268. Nieminen J, Kuno A, Hirabayashi J, Sato S. Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):1374-83.
269. Ahmad N, Gabius HJ, Sabesan S, Oscarson S, Brewer CF. Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Glycobiology*. 2004 Sep;14(9):817-25.
270. Karlsson A, Christenson K, Matlak M, Björstad A, Brown KL, Telemo E, Salomonsson E, Leffler H, Bylund J. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology*. 2009 Jan;19(1):16-20.
271. Flores-Ibarra A, Vértesy S, Medrano FJ, Gabius HJ, Romero A. Crystallization of a human galectin-3 variant with two ordered segments in the shortened N-terminal tail. *Sci Rep*. 2018 Jun 29;8(1):9835.
272. Huflejt ME, Turck CW, Lindstedt R, Barondes SH, Leffler H. L-29, a soluble lactose-binding lectin, is phosphorylated on serine 6 and serine 12 in vivo and by casein kinase I. *J Biol Chem*. 1993 Dec 15;268(35):26712-8.
273. Lepur, A., Salomonsson, E., Nilsson, U. J., and Leffler, H. (2012). Ligand induced galectin-3 protein self-association. *J. Biol. Chem.* 287 (26), 21751–21756. doi:10.1074/jbc.C112.358002
274. Friedrichs J, Manninen A, Muller DJ, Helenius J. Galectin-3 regulates integrin alpha2beta1-mediated adhesion to collagen-I and -IV. *J Biol Chem*. 2008 Nov 21;283(47):32264-72.
275. Nio J, Takahashi-Iwanaga H, Morimatsu M, Kon Y, Iwanaga T. Immunohistochemical and in situ hybridization analysis of galectin-3, a beta-galactoside binding lectin, in the urinary system of adult mice. *Histochem Cell Biol*. 2006 Jul;126(1):45-56.

276. Kim H, Lee J, Hyun JW, Park JW, Joo HG, Shin T. Expression and immunohistochemical localization of galectin-3 in various mouse tissues. *Cell Biol Int.* 2007 Jul;31(7):655-62
277. Nangia-Makker P, Nakahara S, Hogan V, Raz A. Galectin-3 in apoptosis, a novel therapeutic target. *J Bioenerg Biomembr.* 2007 Feb;39(1):79-84.
278. Davidson PJ, Davis MJ, Patterson RJ, Ripoché MA, Poirier F, Wang JL. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology.* 2002 May;12(5):329-37.
279. 28. Ochieng, J.; Furtak, V.; Lukyanov, P. Extracellular Functions of Galectin-3. *Glycoconj. J.* **2002**, 19, 527–535.
280. Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J.* 2002;19(7-9):575-81.
281. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 2002 Jun;23(6):313-20.
282. Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol Biol Cell.* 2004 Aug;15(8):3580-90.
283. Sedlář A, Trávníčková M, Bojarová P, Vlachová M, Slámová K, Křen V, Bačáková L. Interaction between Galectin-3 and Integrins Mediates Cell-Matrix Adhesion in Endothelial Cells and Mesenchymal Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2021 May 13;22(10):5144.
284. Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie.* 2001 Jul;83(7):667-76.
285. Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol.* 1996 May 15;156(10):3939-44.
286. Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 25;93(13):6737-42.
287. Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis.* 2005 Mar;10(2):267-75.
288. Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.* 1997 Dec 1;57(23):5272-6.
289. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, André S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation.* 2004 Nov 9;110(19):3121-8.
290. Sato S, St-Pierre C, Bhaumik P, Nieminen J. Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunol Rev.* 2009 Jul;230(1):172-87.
291. Díaz-Alvarez L, Ortega E. The Many Roles of Galectin-3, a Multifaceted Molecule, in Innate Immune Responses against Pathogens. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:9247574.
292. Jiang JX, Chen X, Hsu DK, Baghy K, Serizawa N, Scott F, Takada Y, Takada Y, Fukada H, Chen J, Devaraj S, Adamson R, Liu FT, Török NJ. Galectin-3 modulates phagocytosis-induced stellate cell activation and liver fibrosis in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012 Feb 15;302(4):G439-46.

293. Dang Z, MacKinnon A, Marson LP, Sethi T. Tubular atrophy and interstitial fibrosis after renal transplantation is dependent on galectin-3. *Transplantation*. 2012 Mar 15;93(5):477-84.
294. Mackinnon AC, Gibbons MA, Farnworth SL, Leffler H, Nilsson UJ, Delaine T, Simpson AJ, Forbes SJ, Hirani N, Gauldie J, Sethi T. Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1-driven lung fibrosis by galectin-3. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Mar 1;185(5):537-46.
295. Stegmayr J, Zetterberg F, Carlsson MC, Huang X, Sharma G, Kahl-Knutson B, Schambye H, Nilsson UJ, Oredsson S, Leffler H. Extracellular and intracellular small-molecule galectin-3 inhibitors. *Sci Rep*. 2019 Feb 18;9(1):2186.
296. Xu H, Liu H, Liu C, Shangguan X, Cheng X, Zhang R, Lu Y, Li P, Cai Y. Molecular characterization and antibacterial ability of galectin-3 and galectin-9 in *Onychostoma macrolepis*. *Dev Comp Immunol*. 2022 Mar;128:104333.
297. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol*. 2000 Aug 15;165(4):2156-64.
298. Chen SC, Kuo PL. The Role of Galectin-3 in the Kidneys. *Int J Mol Sci*. 2016 Apr 14;17(4):565.
299. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 May;3(5):401-16.
300. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, Perretti M, Rossi AG, Wallace JL. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*. 2007 Feb;21(2):325-32.
301. Zuberi RI, Hsu DK, Kalayci O, Chen HY, Sheldon HK, Yu L, Apgar JR, Kawakami T, Lilly CM, Liu FT. Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Am J Pathol*. 2004 Dec;165(6):2045-53.
302. Mok SW, Riemer C, Madela K, Hsu DK, Liu FT, Gültner S, Heise I, Baier M. Role of galectin-3 in prion infections of the CNS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Aug 3;359(3):672-8.
303. Silva-Monteiro E, Reis Lorenzato L, Kenji Nihei O, Junqueira M, Rabinovich GA, Hsu DK, Liu FT, Savino W, Chammas R, Villa-Verde DM. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2007 Feb;170(2):546-56.
304. Ohshima S, Kuchen S, Seemayer CA, Kyburz D, Hirt A, Klinzing S, Michel BA, Gay RE, Liu FT, Gay S, Neidhart M. Galectin 3 and its binding protein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003 Oct;48(10):2788-95.
305. Farnworth SL, Henderson NC, Mackinnon AC, Atkinson KM, Wilkinson T, Dhaliwal K, Hayashi K, Simpson AJ, Rossi AG, Haslett C, Sethi T. Galectin-3 reduces the severity of pneumococcal pneumonia by augmenting neutrophil function. *Am J Pathol*. 2008 Feb;172(2):395-405.
306. Inohara H, Segawa T, Miyauchi A, Yoshii T, Nakahara S, Raz A, Maeda M, Miyoshi E, Kinoshita N, Yoshida H, Furukawa M, Takenaka Y, Takamura Y, Ito Y, Taniguchi N. Cytoplasmic and serum galectin-3 in diagnosis of thyroid malignancies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Nov 21;376(3):605-10.

307. Matsuda Y, Yamagiwa Y, Fukushima K, Ueno Y, Shimosegawa T. Expression of galectin-3 involved in prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2008;38(11):1098-111.
308. Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol.* 2000 Mar;156(3):1073-83.
309. Sato S, Ouellet N, Pelletier I, Simard M, Rancourt A, Bergeron MG. Role of galectin-3 as an adhesion molecule for neutrophil extravasation during streptococcal pneumonia. *J Immunol.* 2002 Feb 15;168(4):1813-22.
310. Suzuki Y, Inoue T, Yoshimaru T, Ra C. Galectin-3 but not galectin-1 induces mast cell death by oxidative stress and mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 2008 May;1783(5):924-34.
311. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol.* 1995 Oct;147(4):1016-28.
312. Fernández GC, Ilarregui JM, Rubel CJ, Toscano MA, Gómez SA, Beigier Bompadre M, Isturiz MA, Rabinovich GA, Palermo MS. Galectin-3 and soluble fibrinogen act in concert to modulate neutrophil activation and survival: involvement of alternative MAPK pathways. *Glycobiology.* 2005 May;15(5):519-27.
313. Nieminen J, St-Pierre C, Bhaumik P, Poirier F, Sato S. Role of galectin-3 in leukocyte recruitment in a murine model of lung infection by *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol.* 2008 Feb 15;180(4):2466-73.
314. Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem.* 2002 May 3;277(18):15819-27.
315. Moon BK, Lee YJ, Battle P, Jessup JM, Raz A, Kim HR. Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: implication of galectin-3 function during metastasis. *Am J Pathol.* 2001 Sep;159(3):1055-60.
316. Saegusa J, Hsu DK, Liu W, Kuwabara I, Kuwabara Y, Yu L, Liu FT. Galectin-3 protects keratinocytes from UVB-induced apoptosis by enhancing AKT activation and suppressing ERK activation. *J Invest Dermatol.* 2008 Oct;128(10):2403-11.
317. Stowell SR, Qian Y, Karmakar S, Koyama NS, Dias Baruffi M, Leffler H, McEver RP & Cummings RD 2008 Differential roles of galectin-1 and galectin-3 in regulating leukocyte viability and cytokine secretion. *Journal of Immunology* 180 3091–3102.
318. Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu FT. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest.* 2003 Aug;112(3):389-97.
319. Karlsson A, Christenson K, Matlak M, Björstad A, Brown KL, Telemo E, Salomonsson E, Leffler H, Bylund J. Galectin-3 functions as an opsonin and enhances the macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Glycobiology.* 2009 Jan;19(1):16-20.
320. Cortegano I, del Pozo V, Cárdbaba B, de Andrés B, Gallardo S, del Amo A, Arrieta I, Jurado A, Palomino P, Liu FT, Lahoz C. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. *J Immunol.* 1998 Jul 1;161(1):385-9.
321. López E, del Pozo V, Miguel T, Sastre B, Seoane C, Civantos E, Llanes E, Baeza ML, Palomino P, Cárdbaba B, Gallardo S, Manzarbeitia F, Zubeldia JM, Lahoz

- C. Inhibition of chronic airway inflammation and remodeling by galectin-3 gene therapy in a murine model. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1943-50.
322. Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff W & Eberlein TJ 2001 Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 69 555–564.
323. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature*. 2001 Feb 8;409(6821):733-9.
324. MacKinnon AC, Farnworth SL, Hodgkinson PS, Henderson NC, Atkinson KM, Leffler H, Nilsson UJ, Haslett C, Forbes SJ, Sethi T. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2650-8.
325. Colnot C, Fowlis D, Ripoche MA, Bouchaert I, Poirier F. Embryonic implantation in galectin 1/galectin 3 double mutant mice. *Dev Dyn*. 1998 Apr;211(4):306-13.
326. Nomoto K, Tsuneyama K, Abdel Aziz HO, Takahashi H, Murai Y, Cui ZG, Fujimoto M, Kato I, Hiraga K, Hsu DK, Liu FT, Takano Y. Disrupted galectin-3 causes non-alcoholic fatty liver disease in male mice. *J Pathol*. 2006 Dec;210(4):469-77.
327. Colnot C, Ripoche MA, Milon G, Montagutelli X, Crocker PR, Poirier F. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. *Immunology*. 1998 Jul;94(3):290-6.
328. Nieminen J, St-Pierre C, Sato S. Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *J Leukoc Biol*. 2005 Nov;78(5):1127-35
329. Breuilh L, Vanhoutte F, Fontaine J, van Stijn CM, Tillie-Leblond I, Capron M, Faveeuw C, Jouault T, van Die I, Gosset P, Trottein F. Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminthic infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5148-57.
330. Bernardes ES, Silva NM, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, Hsu DK, Liu FT, Chammas R, Roque-Barreira MC. *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *Am J Pathol*. 2006 Jun;168(6):1910-20.
331. Iacobini C, Menini S, Oddi G, Ricci C, Amadio L, Pricci F, Olivieri A, Sorcini M, Di Mario U, Pesce C, Pugliese G. Galectin-3/AGE-receptor 3 knockout mice show accelerated AGE-induced glomerular injury: evidence for a protective role of galectin-3 as an AGE receptor. *FASEB J*. 2004 Nov;18(14):1773-5.
332. Peppas M, Brem H, Ehrlich P, Zhang JG, Cai W, Li Z, Croitoru A, Thung S, Vlassara H. Adverse effects of dietary glycotoxins on wound healing in genetically diabetic mice. *Diabetes*. 2003 Nov;52(11):2805-13.
333. Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, Cerami A. Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med*. 1995 Sep;1(6):634-46
334. Pugliese G, Pricci F, Iacobini C, Leto G, Amadio L, Barsotti P, Frigeri L, Hsu DK, Vlassara H, Liu FT, Di Mario U. Accelerated diabetic glomerulopathy in galectin-3/AGE receptor 3 knockout mice. *FASEB J*. 2001 Nov;15(13):2471-9.

335. Canning P, Glenn JV, Hsu DK, Liu FT, Gardiner TA, Stitt AW. Inhibition of advanced glycation and absence of galectin-3 prevent blood-retinal barrier dysfunction during short-term diabetes. *Exp Diabetes Res.* 2007;2007:51837.
336. Stitt AW, McGoldrick C, Rice-McCaldin A, McCance DR, Glenn JV, Hsu DK, Liu FT, Thorpe SR, Gardiner TA. Impaired retinal angiogenesis in diabetes: role of advanced glycation end products and galectin-3. *Diabetes.* 2005 Mar;54(3):785-94.
337. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000 Mar;156(3):899-909.
338. Li Y, Komai-Koma M, Gilchrist DS, Hsu DK, Liu FT, Springall T, Xu D. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *J Immunol.* 2008 Aug 15;181(4):2781-9.
339. Mey A, Leffler H, Hmama Z, Normier G, Revillard JP. The animal lectin galectin-3 interacts with bacterial lipopolysaccharides via two independent sites. *J Immunol.* 1996 Feb 15;156(4):1572-7.
340. Jouault T, El Abed-El Behi M, Martínez-Esparza M, Breuilh L, Trinel PA, Chamailard M, Trottein F, Poulain D. Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol.* 2006 Oct 1;177(7):4679-87.
341. Li LC, Li J, Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *J Pharmacol Exp Ther.* 2014 Nov;351(2):336-43.
342. Dong R, Zhang M, Hu Q, Zheng S, Soh A, Zheng Y, Yuan H. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int J Mol Med.* 2018 Feb;41(2):599-614.
343. Liu Y, Meng H, Xu S, Qi X. Galectins for Diagnosis and Prognostic Assessment of Human Diseases: An Overview of Meta-Analyses. *Med Sci Monit.* 2020 Aug 3;26:e923901.
344. bu-Sinna E, Hasan MY, El-Defdar MM, Amer SA, Abdelsalam LO, Nakhla JA. Galectin-3 and HBME-1 Expression on Agarose Cell Blocks from Fine-needle aspirates of Follicular Cell-derived Thyroid Tumors. *J Cytol.* 2018 Jan-Mar;35(1):27-32.
345. O'Neill RS, Stoita A. Biomarkers in the diagnosis of pancreatic cancer: Are we closer to finding the golden ticket? *World J Gastroenterol.* 2021 Jul 14;27(26):4045-4087
346. Ebrahim AH, Alalawi Z, Mirandola L, Rakhshanda R, Dahlbeck S, Nguyen D, Jenkins M, Grizzi F, Cobos E, Figueroa JA, Chiriva-Internati M. Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Ann Transl Med.* 2014 Sep;2(9):88.
347. Cheng D, Liang B, Li Y. Serum galectin-3 as a potential marker for gastric cancer. *Med Sci Monit.* 2015 Mar 13;21:755-60.
348. Gao N, Yu WZ, Guo NJ, Wang XX, Sun JR. Clinical significance of galectin-3 in patients with adult acute myeloid leukemia: a retrospective cohort study with long-term follow-up and formulation of risk scoring system. *Leuk Lymphoma.* 2017 Jun;58(6):1394-1402.
349. Samura B. GALECTIN-3 AS A PROGNOSTIC BIOMARKER IN PATIENTS WITH NON-HODGKIN LYMPHOMA. *Georgian Med News.* 2015 Nov;(248):7-11.



350. Lambropoulou M, Deftereou TE, Kynigopoulos S, Patsias A, Anagnostopoulos C, Alexiadis G, Kotini A, Tsaroucha A, Nikolaidou C, Kiziridou A, Papadopoulos N, Chatzaki E. Co-expression of galectin-3 and CRIP-1 in endometrial cancer: prognostic value and patient survival. *Med Oncol*. 2016 Jan;33(1):8.
351. Yang LP, Jiang S, Liu JQ, Miao XY, Yang ZL. Up-regulation of galectin-3 and Sambucus nigra agglutinin binding site is associated with invasion, metastasis and poor-progression of the gallbladder adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology*. 2012 Oct;59(119):2089-94.
352. Slack RJ, Mills R, Mackinnon AC. The therapeutic potential of galectin-3 inhibition in fibrotic disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2021 Jan;130:105881
353. Besler C, Lang D, Urban D, Rommel KP, von Roeder M, Fengler K, Blazek S, Kandolf R, Klingel K, Thiele H, Linke A, Schuler G, Adams V, Lurz P. Plasma and Cardiac Galectin-3 in Patients With Heart Failure Reflects Both Inflammation and Fibrosis: Implications for Its Use as a Biomarker. *Circ Heart Fail*. 2017 Mar;10(3):e003804.
354. an Vark LC, Lesman-Leege I, Baart SJ, Postmus D, Pinto YM, Orsel JG, Westenbrink BD, Brunner-la Rocca HP, van Miltenburg AJM, Boersma E, Hillege HL, Akkerhuis KM; TRIUMPH Investigators. Prognostic Value of Serial ST2 Measurements in Patients With Acute Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Nov 7;70(19):2378-2388.
355. Winyard PJ, Bao Q, Hughes RC, Woolf AS. Epithelial galectin-3 during human nephrogenesis and childhood cystic diseases. *J Am Soc Nephrol*. 1997 Nov;8(11):1647-57.
356. Bao Q, Hughes RC. Galectin-3 expression and effects on cyst enlargement and tubulogenesis in kidney epithelial MDCK cells cultured in three-dimensional matrices in vitro. *J Cell Sci*. 1995 Aug;108 ( Pt 8):2791-800.
357. Bichara M, Attmane-Elakeb A, Brown D, Essig M, Karim Z, Muffat-Joly M, Micheli L, Eude-Le Parco I, Cluzeaud F, Peuchmaur M, Bonvalet JP, Poirier F, Farman N. Exploring the role of galectin 3 in kidney function: a genetic approach. *Glycobiology*. 2006 Jan;16(1):36-45.
358. Herrmann J, Turck CW, Atchison RE, Huflejt ME, Poulter L, Gitt MA, Burlingame AL, Barondes SH, Leffler H. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine-, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *J Biol Chem*. 1993 Dec 15;268(35):26704-11.
359. Fernandes Bertocchi AP, Campanhole G, Wang PH, Gonçalves GM, Damião MJ, Cenedeze MA, Beraldo FC, de Paula Antunes Teixeira V, Dos Reis MA, Mazzali M, Pacheco-Silva A, Câmara NO. A Role for galectin-3 in renal tissue damage triggered by ischemia and reperfusion injury. *Transpl Int*. 2008 Oct;21(10):999-1007.
360. Prud'homme M, Coutrot M, Michel T, Boutin L, Genest M, Poirier F, Launay JM, Kane B, Kinugasa S, Prakoura N, Vandermeersch S, Cohen-Solal A, Delcayre C, Samuel JL, Mehta R, Gayat E, Mebazaa A, Chadjichristos CE, Legrand M. Acute Kidney Injury Induces Remote Cardiac Damage and Dysfunction Through the Galectin-3 Pathway. *JACC Basic Transl Sci*. 2019 Oct 28;4(6):717-732.
361. Vanstherthem D, Cludts S, Nonclercq D, Gossiaux A, Saussez S, Legrand A, Gabius HJ, Toubreau G. Immunohistochemical localization of galectins-1 and -3 and monitoring of tissue galectin-binding sites during tubular regeneration after renal ischemia reperfusion in the rat. *Histol Histopathol*. 2010 Nov;25(11):1417-29.

362. Henderson NC, Mackinnon AC, Farnworth SL, Kipari T, Haslett C, Iredale JP, Liu FT, Hughes J, Sethi T. Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis. *Am J Pathol.* 2008 Feb;172(2):288-98.
363. Kolatsi-Joannou M, Price KL, Winyard PJ, Long DA. Modified citrus pectin reduces galectin-3 expression and disease severity in experimental acute kidney injury. *PLoS One.* 2011 Apr 8;6(4):e18683.
364. Li HY, Yang S, Li JC, Feng JX. Galectin 3 inhibition attenuates renal injury progression in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biosci Rep.* 2018 Dec 18;38(6):BSR20181803.
365. Volarevic V, Markovic BS, Jankovic MG, Djokovic B, Jovicic N, Harrell CR, Fellabaum C, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic ML. Galectin 3 protects from cisplatin-induced acute kidney injury by promoting TLR-2-dependent activation of IDO1/Kynurenine pathway in renal DCs. *Theranostics.* 2019 Aug 14;9(20):5976-6001.
366. Pugliese G, Pricci F, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Romeo G, Lenti L, Sale P, Gradini R, Liu FT, Di Mario U. The diabetic milieu modulates the advanced glycation end product-receptor complex in the mesangium by inducing or upregulating galectin-3 expression. *Diabetes.* 2000 Jul;49(7):1249-57.
367. Zhang P, Sun Y, Peng R, Chen W, Fu X, Zhang L, Peng H, Zhang Z. Long non-coding RNA Rpph1 promotes inflammation and proliferation of mesangial cells in diabetic nephropathy via an interaction with Gal-3. *Cell Death Dis.* 2019 Jul 8;10(7):526.
368. Frenay AR, Yu L, van der Velde AR, Vreeswijk-Baudoin I, López-Andrés N, van Goor H, Silljé HH, Ruifrok WP, de Boer RA. Pharmacological inhibition of galectin-3 protects against hypertensive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015 Mar 1;308(5):F500-9.
369. Sasaki S, Bao Q, Hughes RC. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies. *J Pathol.* 1999 Mar;187(4):481-9.
370. Sun H, Jiang H, Eliaz A, Kellum JA, Peng Z, Eliaz I. Galectin-3 in septic acute kidney injury: a translational study. *Crit Care.* 2021 Mar 18;25(1):109.
371. Chiu MG, Johnson TM, Woolf AS, Dahm-Vicker EM, Long DA, Guay-Woodford L, Hillman KA, Bawumia S, Venner K, Hughes RC, Poirier F, Winyard PJ. Galectin-3 associates with the primary cilium and modulates cyst growth in congenital polycystic kidney disease. *Am J Pathol.* 2006 Dec;169(6):1925-38.
372. Desmedt V, Desmedt S, Delanghe JR, Speeckaert R, Speeckaert MM. Galectin-3 in Renal Pathology: More Than Just an Innocent Bystander. *Am J Nephrol.* 2016;43(5):305-17.
373. Nishi Y, Sano H, Kawashima T, Okada T, Kuroda T, Kikkawa K, Kawashima S, Tanabe M, Goto T, Matsuzawa Y, Matsumura R, Tomioka H, Liu FT, Shirai K. Role of galectin-3 in human pulmonary fibrosis. *Allergol Int.* 2007 Mar;56(1):57-65.
374. Okamura DM, Pasichnyk K, Lopez-Guisa JM, Collins S, Hsu DK, Liu FT, Eddy AA. Galectin-3 preserves renal tubules and modulates extracellular matrix remodeling in progressive fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011 Jan;300(1):F245-53.
375. Gasparitsch M, Arndt AK, Pawlitschek F, Oberle S, Keller U, Kasper M, Bierhaus A, Schaefer F, Weber LT, Lange-Sperandio B. RAGE-mediated interstitial

- fibrosis in neonatal obstructive nephropathy is independent of NF- $\kappa$ B activation. *Kidney Int.* 2013 Nov;84(5):911-9.
376. Martinez-Martinez E, Ibarrola J, Calvier L, Fernandez-Celis A, Leroy C, Cachofeiro V, Rossignol P, Lopez-Andres N. Galectin-3 Blockade Reduces Renal Fibrosis in Two Normotensive Experimental Models of Renal Damage. *PLoS One.* 2016 Nov 9;11(11):e0166272.
  377. Boutin, L.; Dépret, F.; Samuel, J.L.; Legrand, M.; Mebazaa, A.; Gayat, E.; Chadjichristos, C. Impact of Galectin-3 Tissue Deletion in Renal Damage and Type-3 Cardio-Renal Syndrome. *Néphrologie Thérapeutique* **2021**, 17, 284.
  378. Hara A, Niwa M, Noguchi K, Kanayama T, Niwa A, Matsuo M, Hatano Y, Tomita H. Galectin-3 as a Next-Generation Biomarker for Detecting Early Stage of Various Diseases. *Biomolecules.* 2020 Mar 3;10(3):389.
  379. Drechsler C, Delgado G, Wanner C, Blouin K, Pilz S, Tomaschitz A, Kleber ME, Dressel A, Willmes C, Krane V, Krämer BK, März W, Ritz E, van Gilst WH, van der Harst P, de Boer RA. Galectin-3, Renal Function, and Clinical Outcomes: Results from the LURIC and 4D Studies. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Sep;26(9):2213-21.
  380. Wyler von Ballmoos M, Likosky DS, Rezaee M, Lobdell K, Alam S, Parker D, Owens S, Thiessen-Philbrook H, MacKenzie T, Brown JR. Elevated preoperative Galectin-3 is associated with acute kidney injury after cardiac surgery. *BMC Nephrol.* 2018 Oct 20;19(1):280
  381. Tan KCB, Cheung CL, Lee ACH, Lam JKY, Wong Y, Shiu SWM. Galectin-3 is independently associated with progression of nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2018 May;61(5):1212-1219.
  382. Boutin L, Legrand M, Sadoune M, Mebazaa A, Gayat E, Chadjichristos CE, Dépret F. Elevated plasma Galectin-3 is associated with major adverse kidney events and death after ICU admission. *Crit Care.* 2022 Jan 6;26(1):13.
  383. Kikuchi Y, Kobayashi S, Hemmi N, Ikee R, Hyodo N, Saigusa T, Namikoshi T, Yamada M, Suzuki S, Miura S. Galectin-3-positive cell infiltration in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Mar;19(3):602-7.
  384. Kang EH, Moon KC, Lee EY, Lee YJ, Lee EB, Ahn C, Song YW. Renal expression of galectin-3 in systemic lupus erythematosus patients with nephritis. *Lupus.* 2009 Jan;18(1):22-8.
  385. Ostalska-Nowicka D, Nowicki M, Kondraciuk B, Partyka M, Samulak D, Witt M. Expression of galectin-3 in nephrotic syndrome glomerulopathies in children. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009;47(2):315-22.
  386. Yilmaz H, Inan O, Darcin T, Bilgic MA, Akcay A. Serum galectin-3 levels were associated with proteinuria in patients with Familial Mediterranean Fever. *Clin Exp Nephrol.* 2015 Jun;19(3):436-42.
  387. Hussain S, Habib A, Hussain MS, Najmi AK. Potential biomarkers for early detection of diabetic kidney disease. *Diabetes Res Clin Pract.* 2020 Mar;161:108082.
  388. Alam ML, Katz R, Bellovich KA, Bhat ZY, Brosius FC, de Boer IH, Gadegbeku CA, Gipson DS, Hawkins JJ, Himmelfarb J, Kestenbaum BR, Kretzler M, Robinson-Cohen C, Steigerwalt SP, Tuegel C, Bansal N. Soluble ST2 and Galectin-3 and Progression of CKD. *Kidney Int Rep.* 2018 Sep 21;4(1):103-111.
  389. Rebholz CM, Selvin E, Liang M, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Aguilar D, McEvoy JW, Grams ME, Coresh J. Plasma galectin-3 levels are associated with the risk of incident chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2018 Jan;93(1):252-259.

390. Kim AJ, Ro H, Kim H, Chang JH, Lee HH, Chung W, Jung JY. Soluble ST2 and Galectin-3 as Predictors of Chronic Kidney Disease Progression and Outcomes. *Am J Nephrol.* 2021;52(2):119-130
391. Ou SM, Tsai MT, Chen HY, Li FA, Tseng WC, Lee KH, Chang FP, Lin YP, Yang RB, Tarng DC. Identification of Galectin-3 as Potential Biomarkers for Renal Fibrosis by RNA-Sequencing and Clinicopathologic Findings of Kidney Biopsy. *Front Med (Lausanne).* 2021 Nov 12;8:748225.
392. Sotomayor CG, Te Velde-Keyzer CA, Diepstra A, van Londen M, Pol RA, Post A, Gans ROB, Nolte IM, Slart RHJA, de Borst MH, Berger SP, Rodrigo R, Navis GJ, de Boer RA, Bakker SJL. Galectin-3 and Risk of Late Graft Failure in Kidney Transplant Recipients: A 10-year Prospective Cohort Study. *Transplantation.* 2021 May 1;105(5):1106-1115.
393. Zhang X, Wan Y, Chata R, Brazzale A, Atherton JJ, Kostner K, Dimeski G, Punyadeera C. A pilot study to demonstrate diagnostic potential of galectin-3 levels in saliva. *J Clin Pathol.* 2016 Dec;69(12):1100-1104.
394. Hara A, Niwa M, Kanayama T, Noguchi K, Niwa A, Matsuo M, Kuroda T, Hatano Y, Okada H, Tomita H. Galectin-3: A Potential Prognostic and Diagnostic Marker for Heart Disease and Detection of Early Stage Pathology. *Biomolecules.* 2020 Sep 4;10(9):1277.
395. A Phase 2a Study of Weekly Doses of GCS-100 in Patients with Chronic Kidney Disease—Full Text View—ClinicalTrials.Gov. Available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01843790> (accessed on 19 January 2022).
396. La Jolla Pharmaceutical Company Reports Positive, Top-Line Results from Phase 2 Clinical Trial of GCS-100 in Chronic Kidney Disease. Press Release Data Mar 10. Available online: <https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/920465/000092046514000012/pressreleasedatamar10.htm> (accessed on 25 January 2022).
397. Lau ES, Liu E, Paniagua SM, Sarma AA, Zampierollo G, López B, Díez J, Wang TJ, Ho JE. Galectin-3 Inhibition With Modified Citrus Pectin in Hypertension. *JACC Basic Transl Sci.* 2021 Jan 6;6(1):12-21.
398. Hirani N, MacKinnon AC, Nicol L, Ford P, Schambye H, Pedersen A, Nilsson UJ, Leffler H, Sethi T, Tantawi S, Gravelle L, Slack RJ, Mills R, Karmakar U, Humphries D, Zetterberg F, Keeling L, Paul L, Molyneaux PL, Li F, Funston W, Forrest IA, Simpson AJ, Gibbons MA, Maher TM. Target inhibition of galectin-3 by inhaled TD139 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 2021 May 27;57(5):2002559.
399. Friedman LA, Ring KL, Mills AM. LAG-3 and GAL-3 in Endometrial Carcinoma: Emerging Candidates for Immunotherapy. *Int J Gynecol Pathol.* 2020 May;39(3):203-212.
400. Balan V, Nangia-Makker P, Schwartz AG, Jung YS, Tait L, Hogan V, Raz T, Wang Y, Yang ZQ, Wu GS, Guo Y, Li H, Abrams J, Couch FJ, Lingle WL, Lloyd RV, Ethier SP, Tainsky MA, Raz A. Racial disparity in breast cancer and functional germ line mutation in galectin-3 (rs4644): a pilot study. *Cancer Res.* 2008 Dec 15;68(24):10045-50.
401. Mendonça Belmont TF, do Ó KP, Soares da Silva A, de Melo Vilar K, Silva Medeiros F, Silva Vasconcelos LR, Mendonça Dos Anjos AC, Domingues Hatzlhofer BL, Pitta MG, Bezerra MA, Araújo Ada S, de Melo Rego MJ, Moura P, Cavalcanti

- Mdo S. Single Nucleotide Polymorphisms at +191 and +292 of Galectin-3 Gene (LGALS3) Related to Lower GAL-3 Serum Levels Are Associated with Frequent Respiratory Tract Infection and Vaso-Occlusive Crisis in Children with Sickle Cell Anemia. *PLoS One*. 2016 Sep 7;11(9):e0162297.
402. Djordjevic A, Zivkovic M, Stankovic A, Zivotic I, Koncar I, Davidovic L, Alavantic D, Djuric T. Genetic Variants in the Vicinity of LGALS-3 Gene and LGALS-3 mRNA Expression in Advanced Carotid Atherosclerosis: An Exploratory Study. *J Clin Lab Anal*. 2016 Nov;30(6):1150-1157.
403. Cunha EGC, de Lima CAD, Vilar KM, Nóbrega MF, Almeida AR, Pereira MC, Dantas AT, Gonçalves RSG, Rêgo MJB, Duarte ALBP, Pitta MGDR. Genetic variants in *LGALS3* are related to lower galectin-3 serum levels and clinical outcomes in systemic sclerosis patients: A case-control study. *Autoimmunity*. 2021 Jun;54(4):187-194.
404. Taniguchi T, Asano Y, Akamata K, Noda S, Masui Y, Yamada D, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Tamaki Z, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S. Serum levels of galectin-3: possible association with fibrosis, aberrant angiogenesis, and immune activation in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2012 Mar;39(3):539-44.
405. Koca SS, Akbas F, Ozgen M, Yolbas S, Ilhan N, Gundogdu B, Isik A. Serum galectin-3 level in systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2014 Feb;33(2):215-20.
406. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215.
407. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005 Jan 15;21(2):263-5.
408. Obrador GT, Schultheiss UT, Kretzler M, Langham RG, Nangaku M, Pecoits-Filho R, Pollock C, Rossert J, Correa-Rotter R, Stenvinkel P, Walker R, Yang CW, Fox CS, Köttgen A. Genetic and environmental risk factors for chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* (2011). 2017 Oct;7(2):88-106.
409. Linda WH, Klag MJ, Meoni IA, et al (2008) MYH9 is associated with nondiabetic end-stage renal disease in African Americans. *Nat Genet* 40:1185–1192.
410. Winkler CA, Nelson G, Oleksyk TK, Nava MB, Kopp JB. Genetics of focal segmental glomerulosclerosis and human immunodeficiency virus-associated collapsing glomerulopathy: the role of MYH9 genetic variation. *Semin Nephrol*. 2010 Mar;30(2):111-25.
411. Freedman BI, Hicks PJ, Bostrom MA, Cunningham ME, Liu Y, Divers J, Kopp JB, Winkler CA, Nelson GW, Langefeld CD, Bowden DW. Polymorphisms in the non-muscle myosin heavy chain 9 gene (MYH9) are strongly associated with end-stage renal disease historically attributed to hypertension in African Americans. *Kidney Int*. 2009 Apr;75(7):736-45.
412. Levin A, Tonelli M, Bonventre J, Coresh J, Donner JA, Fogo AB, Fox CS, Gansevoort RT, Heerspink HJL, Jardine M, Kasiske B, Köttgen A, Kretzler M, Levey AS, Luyckx VA, Mehta R, Moe O, Obrador G, Pannu N, Parikh CR, Perkovic V, Pollock C, Stenvinkel P, Tuttle KR, Wheeler DC, Eckardt KU; ISN Global Kidney Health Summit participants. Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy. *Lancet*. 2017 Oct 21;390(10105):1888-1917.

413. Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med*. 2010 Jul 8;363(2):166-76.
414. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*. 2011 Sep 27;12(11):745-55.
415. Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet*. 2012 Jan 13;90(1):7-24.
416. Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, Boehm C, Sobreira N, Smith JD, Harrell TM, McMillin MJ, Wiszniewski W, Gambin T, Coban Akdemir ZH, Doheny K, Scott AF, Avramopoulos D, Chakravarti A, Hoover-Fong J, Mathews D, Witmer PD, Ling H, Hetrick K, Watkins L, Patterson KE, Reinier F, Blue E, Muzny D, Kircher M, Bilguvar K, López-Giráldez F, Sutton VR, Tabor HK, Leal SM, Gunel M, Mane S, Gibbs RA, Boerwinkle E, Hamosh A, Shendure J, Lupski JR, Lifton RP, Valle D, Nickerson DA; Centers for Mendelian Genomics, Bamshad MJ. The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet*. 2015 Aug 6;97(2):199-215.
417. Vivante A, Hildebrandt F. Exploring the genetic basis of early-onset chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2016 Mar;12(3):133-46.
418. Wuttke M, Köttgen A. Insights into kidney diseases from genome-wide association studies. *Nat Rev Nephrol*. 2016 Sep;12(9):549-62.
419. Soderland P, Lovekar S, Weiner DE, Brooks DR, Kaufman JS. Chronic kidney disease associated with environmental toxins and exposures. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010 May;17(3):254-64.
420. Weaver VM, Fadrowski JJ, Jaar BG. Global dimensions of chronic kidney disease of unknown etiology (CKDu): a modern era environmental and/or occupational nephropathy? *BMC Nephrol*. 2015 Aug 19;16:145.
421. Martín-Cleary C, Ortiz A. CKD hotspots around the world: where, why and what the lessons are. A CKJ review series. *Clin Kidney J*. 2014 Dec;7(6):519-23.
422. Lunyera J, Mohottige D, Von Isenburg M, Jeuland M, Patel UD, Stanifer JW. CKD of Uncertain Etiology: A Systematic Review. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 Mar 7;11(3):379-85.
423. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013 Jul 20;382(9888):260-72.
424. Ordunez P, Saenz C, Martinez R, Chapman E, Reveiz L, Becerra F. The epidemic of chronic kidney disease in Central America. *Lancet Glob Health*. 2014 Aug;2(8):e440-1.
425. Abraham G, Varughese S, Thandavan T, Iyengar A, Fernando E, Naqvi SA, Sheriff R, Ur-Rashid H, Gopalakrishnan N, Kafle RK. Chronic kidney disease hotspots in developing countries in South Asia. *Clin Kidney J*. 2016 Feb;9(1):135-41.
426. Stanifer JW, Muiru A, Jafar TH, Patel UD. Chronic kidney disease in low- and middle-income countries. *Nephrol Dial Transplant*. 2016 Jun;31(6):868-74.
427. Chen HJ, Zheng ZC, Yuan BQ, Liu Z, Jing J, Wang SS. The effect of galectin-3 genetic variants on the susceptibility and prognosis of gliomas in a Chinese population. *Neurosci Lett*. 2012 Jun 14;518(1):1-4.
428. Wu F, Hu N, Li Y, Bian B, Xu G, Zheng Y. Galectin-3 genetic variants are associated with platinum-based chemotherapy response and prognosis in patients with NSCLC. *Cell Oncol (Dordr)*. 2012 Jun;35(3):175-80.

429. Bozcali E, Polat V, Aciksari G, Opan S, Bayrak IH, Paker N, Karakaya O. Serum concentrations of galectin-3 in patients with cardiac syndrome X. *Atherosclerosis*. 2014 Nov;237(1):259-63.
430. Jin QH, Lou YF, Li TL, Chen HH, Liu Q, He XJ. Serum galectin-3: a risk factor for vascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(11):2109-15.
431. Srivatsan V, George M, Shanmugam E. Utility of galectin-3 as a prognostic biomarker in heart failure: where do we stand? *Eur J Prev Cardiol*. 2015 Sep;22(9):1096-110.
432. Zhang R, Sun T, Song L, Zuo D, Xiao W. Increased levels of serum galectin-3 in patients with primary Sjögren's syndrome: associated with interstitial lung disease. *Cytokine*. 2014 Oct;69(2):289-93.
433. Liao YH, Teng MS, Juang JJ, Chiang FT, Er LK, Wu S, Ko YL. Genetic determinants of circulating galectin-3 levels in patients with coronary artery disease. *Mol Genet Genomic Med*. 2020 Sep;8(9):e1370.
434. Winter MP, Wiesbauer F, Alimohammadi A, Blessberger H, Pavo N, Schillinger M, Huber K, Wojta J, Lang IM, Maurer G, Goliash G. Soluble galectin-3 is associated with premature myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*. 2016 May;46(5):386-91.
435. Ge XN, Ha SG, Liu FT, Rao SP, Sriramarao P. Eosinophil-expressed galectin-3 regulates cell trafficking and migration. *Front Pharmacol*. 2013 Apr 5;4:37.
436. Chen C, Duckworth CA, Zhao Q, Pritchard DM, Rhodes JM, Yu LG. Increased circulation of galectin-3 in cancer induces secretion of metastasis-promoting cytokines from blood vascular endothelium. *Clin Cancer Res*. 2013 Apr 1;19(7):1693-704.
437. Ortega N, Behonick DJ, Colnot C, Cooper DN, Werb Z. Galectin-3 is a downstream regulator of matrix metalloproteinase-9 function during endochondral bone formation. *Mol Biol Cell*. 2005 Jun;16(6):3028-39.
438. Nangia-Makker P, Raz T, Tait L, Hogan V, Fridman R, Raz A. Galectin-3 cleavage: a novel surrogate marker for matrix metalloproteinase activity in growing breast cancers. *Cancer Res*. 2007 Dec 15;67(24):11760-8.
439. Mauris J, Woodward AM, Cao Z, Panjwani N, Argüeso P. Molecular basis for MMP9 induction and disruption of epithelial cell-cell contacts by galectin-3. *J Cell Sci*. 2014 Jul 15;127(Pt 14):3141-8.
440. Zhang D, Chen ZG, Liu SH, Dong ZQ, Dalin M, Bao SS, Hu YW, Wei FC. Galectin-3 gene silencing inhibits migration and invasion of human tongue cancer cells in vitro via downregulating  $\beta$ -catenin. *Acta Pharmacol Sin*. 2013 Jan;34(1):176-84.
441. Dange MC, Agarwal AK, Kalraiya RD. Extracellular galectin-3 induces MMP9 expression by activating p38 MAPK pathway via lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP1). *Mol Cell Biochem*. 2015 Jun;404(1-2):79-86.
442. Hu CY, Chang SK, Wu CS, Tsai WI, Hsu PN. Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in Taiwan. *Clin Rheumatol*. 2011 Sep;30(9):1227-33.
443. Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*. 2009 Dec 17;583(24):3966-73.
444. Bansal N, Katz R, Seliger S, DeFilippi C, Sarnak MJ, Delaney JA, Christenson R, de Boer IH, Kestenbaum B, Robinson-Cohen C, Ix JH, Shlipak MG. Galectin-3 and

- Soluble ST2 and Kidney Function Decline in Older Adults: The Cardiovascular Health Study (CHS). *Am J Kidney Dis.* 2016 Jun;67(6):994-6.
445. Papaspyridonos M, McNeill E, de Bono JP, Smith A, Burnand KG, Channon KM, Greaves DR. Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Mar;28(3):433-40.
  446. Aksan G, Gedikli Ö, Keskin K, Nar G, İnci S, Yıldız SS, Kaplan Ö, Soylu K, Kılıçkesmez KO, Şahin M. Is galectin-3 a biomarker, a player-or both-in the presence of coronary atherosclerosis? *J Investig Med.* 2016 Mar;64(3):764-70.
  447. Calvier L, Miana M, Reboul P, Cachofeiro V, Martinez-Martinez E, de Boer RA, Poirier F, Lacolley P, Zannad F, Rossignol P, López-Andrés N. Galectin-3 mediates aldosterone-induced vascular fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Jan;33(1):67-75.
  448. Azibani F, Fazal L, Chatziantoniou C, Samuel JL, Delcayre C. Aldosterone mediates cardiac fibrosis in the setting of hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2013 Aug;15(4):395-400.
  449. Lin YH, Chou CH, Wu XM, Chang YY, Hung CS, Chen YH, Tzeng YL, Wu VC, Ho YL, Hsieh FJ, Wu KD; TAIPAI Study Group. Aldosterone induced galectin-3 secretion in vitro and in vivo: from cells to humans. *PLoS One.* 2014 Sep 2;9(9):e95254.
  450. Mensah-Brown EP, Al Rabesi Z, Shahin A, Al Shamsi M, Arsenijevic N, Hsu DK, Liu FT, Lukic ML. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in decreased susceptibility to multiple low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Clin Immunol.* 2009 Jan;130(1):83-8.
  451. Pang J, Rhodes DH, Pini M, Akasheh RT, Castellanos KJ, Cabay RJ, Cooper D, Perretti M, Fantuzzi G. Increased adiposity, dysregulated glucose metabolism and systemic inflammation in Galectin-3 KO mice. *PLoS One.* 2013;8(2):e57915.
  452. Pejnovic NN, Pantic JM, Jovanovic IP, Radosavljevic GD, Milovanovic MZ, Nikolic IG, Zdravkovic NS, Djukic AL, Arsenijevic NN, Lukic ML. Galectin-3 deficiency accelerates high-fat diet-induced obesity and amplifies inflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Diabetes.* 2013 Jun;62(6):1932-44.
  453. Saksida T, Nikolic I, Vujcic M, Nilsson UJ, Leffler H, Lukic ML, Stojanovic I, Stosic-Grujicic S. Galectin-3 deficiency protects pancreatic islet cells from cytokine-triggered apoptosis in vitro. *J Cell Physiol.* 2013 Jul;228(7):1568-76.
  454. Darrow AL, Shohet RV, Maresh JG. Transcriptional analysis of the endothelial response to diabetes reveals a role for galectin-3. *Physiol Genomics.* 2011 Oct 20;43(20):1144-52.
  455. Karlsten AE, Størling ZM, Sparre T, Larsen MR, Mahmood A, Størling J, Roepstorff P, Wrzesinski K, Larsen PM, Fey S, Nielsen K, Heding P, Ricordi C, Johannesen J, Kristiansen OP, Christensen UB, Kockum I, Luthman H, Nerup J, Pociot F. Immune-mediated beta-cell destruction in vitro and in vivo-A pivotal role for galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 May 26;344(1):406-15.
  456. Pugliese G, Iacobini C, Ricci C, Blasetti Fantauzzi C, Menini S. Galectin-3 in diabetic patients. *Clin Chem Lab Med.* 2014 Oct;52(10):1413-23.
  457. Weigert J, Neumeier M, Wanninger J, Bauer S, Farkas S, Scherer MN, Schnitzbauer A, Schäffler A, Aslanidis C, Schölmerich J, Buechler C. Serum galectin-3 is elevated in obesity and negatively correlates with glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Mar;95(3):1404-11.



458. Yilmaz H, Celik HT, Ozdemir O, Kalkan D, Namuslu M, Abusoglu S, Atalay CR, Yigitoglu R. Serum galectin-3 levels in women with PCOS. *J Endocrinol Invest.* 2014 Feb;37(2):181-7.
459. Ma S, Li S, Lv R, Hou X, Nie S, Yin Q. Prevalence of mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus is associated with serum galectin-3 level. *J Diabetes Investig.* 2020 Sep;11(5):1295-1302.
460. Ibrahim BA, Mohamed SH, Hassaan MMM, Sabbah NA. Associations of galectin-3 expression and LGALS-3 (rs4652) gene variant with coronary artery disease risk in diabetics. *J Med Biochem.* 2021 Sep 3;40(4):395-406.
461. Atabaki M, Hashemi M, Daneshvar H, Alijani E. Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 rs4652 A/C gene variation and the risk for rheumatoid arthritis. *Biomed Rep.* 2017 Feb;6(2):251-255.
462. Menini S, Iacobini C, Blasetti Fantauzzi C, Pesce CM, Pugliese G. Role of Galectin-3 in Obesity and Impaired Glucose Homeostasis. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:9618092.
463. Iacobini C, Amadio L, Oddi G, Ricci C, Barsotti P, Missori S, Sorcini M, Di Mario U, Pricci F, Pugliese G. Role of galectin-3 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Aug;14(8 Suppl 3):S264-70.
464. Karolko B, Serafin A, Przewłocka-Kosmala M. Impact of moderately reduced renal function on the diagnostic and prognostic value of galectin-3 in patients with exertional dyspnea. *Adv Clin Exp Med.* 2022 Aug;31(8):873-879.
465. Yilmaz H, Cakmak M, Inan O, Darcin T, Akcay A. Increased levels of galectin-3 were associated with prediabetes and diabetes: new risk factor? *J Endocrinol Invest.* 2015 May;38(5):527-33.

## БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Зоран Ковачевић је рођен 12.03.1974. године у Шапцу. Основну и средњу школу (Гимназија) је завршио у Шапцу. Медицински факултет, Универзитета у Крагујевцу је уписао школске 1993/94 године (основне студије медицине, доктор медицине), а на истом је дипломирао 1999. године са просечном оценом 8,11. Специјалистички испит из области Интерне медицина положио је 2007. године на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу са оценом 5, чиме је стекао звање специјалисте интерне медицине. Школске 2008/09 године је уписао Докторске академске студије на Медицинском факултету, Универзитета у Крагујевцу, а усмени докторски испит из области ендокринологија је положио 2011. године. са оценом 10. Тренутно је у фази израде докторске дисертације. Ужу специјализацију из области нефрологије је уписао школске 2016. године и успешно завршио 2018. године. У октобру 2020. године Министар здравља Републике Србије доделио му је назив Примаријус. Радно искуство је започео на Медицинском факултету Универзитета у Крагујевцу као сарадник на предмету Клиничка и експериментална фармакологија, а затим у КЦ Крагујевац, Центар за ургентну медицину и на Интерној клиници – Центар за гастроентерохепатологију. Од 2021. Године стално запослен на Клиници за нефрологију и дијализу, УКЦ Крагујевац.

## БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Kovacevic Z**, Lazarevic T, Maksimovic N, Grk M, Volarevic V, Gazdic Jankovic M, Djukic S, Janicijevic K, Miletic Kovacevic M, Ljujic B. Galectin 3 (LGALS3) Gene Polymorphisms Are Associated with Biochemical Parameters and Primary Disease in Patients with End-Stage Renal Disease in Serbian Population. J Clin Med. 2022;11:3874, **M21**
2. **Kovačević Z**, Cvetković O, Janićijević K, Janićijević Petrović M, Cvetković M, Zornić N. The clinical analysis of peritonitis in peritoneal dialysis patients. Srpski Arhiv za celokupno lekarstvo 2021; 149 (5-6): 282-287, **M23**
3. Lazarević T, Petrović D, Novković Lj, Janićijević K, Janićijević Petrović M, Vujić A, Ljujić B, Sazdanović M, **Kovačević Z**. Assessment of volemia status in ultrasound examination of the inferior vena cava and spectroscopic bioimpedance in hemodialysis patients. Vojno sanitetski pregled 2022; 79 (5): 456–464, **M23**

*Образац 1*

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

“Полиморфизми гена за галектин -3 код болесника у терминалној фази реналне инсуфицијенције“

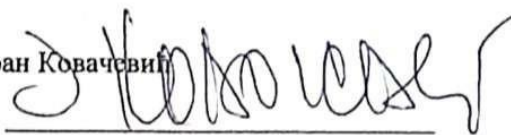
представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 21.10.2022 године,

Зоран Ковачевић



потпис аутора

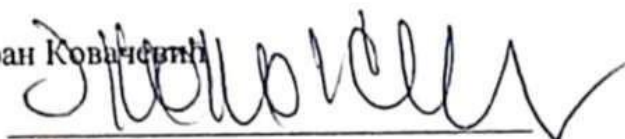
*Образац 2*

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:  
“Полиморфизми гена за галектин -3 код болесника у терминалној фази реналне  
инсуфицијенције“  
истоветне.

У Крагујевцу, 21.10.2022године,

Зоран Ковачевић



потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја,                    Зоран Ковачевић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

“Полиморфизми гена за галектин -3 код болесника у терминалној фази реналне инсуфицијенције“

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајнодоступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

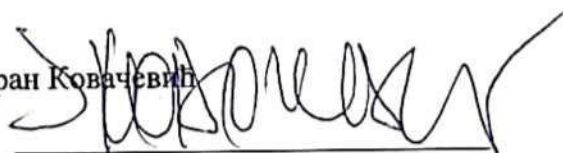
---

<sup>1</sup>Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У Крагујевцу, 21.10.2022године,

Зоран Ковачевић



потпис аутора

---

<sup>2</sup>Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

